

# **Das strukturelle Korrelat der linksventrikulären Funktionseinschränkung bei Patienten mit Aortenklappenstenose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von  
aus

Farzaneh Badbanchi  
Teheran / Iran

Giessen

2001

Aus dem Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerkhoff-Institut  
Abteilung Experimentelle Kardiologie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper  
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper  
Gutachter: Prof. Dr. G. Görlach

Tag der Disputation: 18. Juni 2002

*für meinen Mann Abdi und meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>5</b>
2.1. Patientenpopulation	5
2.2. Gewebe	6
2.3. Mikrotomie	7
2.4. Immunhistochemie	8
2.5. Fixierung	8
2.6. Erster Antikörper	9
2.7. Zweiter Antikörper	10
2.8. Fluorochrom	10
2.9. Kernfärbung	11
2.10. Eindecken	11
2.11. Kontrolle	12
2.12. Fluoreszenzmikroskopie	12
2.13. Konfokale Mikroskopie	13
2.14. Dokumentation	14
2.15. Bildverarbeitung	15
2.16. Fluoreszenzintensität	16
2.17. Morphometrie	17
2.18. Myozytengrößen	17
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1. Myozytengröße	19
3.2. Zytoskelettäres Protein	20
3.2.1. Desmin	20

	<b>Seite</b>
3.3. Extrazelluläre Matrix	20
3.3.1. Fibronectin	20
3.3.2. Laminin	24
3.3.3. Kollagen I	26
3.3.4. Chondroitinsulfat	28
3.4. Adhäsionsmoleküle und Blutzellen	28
3.4.1. CD31 (PECAM)	29
3.4.2. CD54 (ICAM)	31
3.4.3. CD68	32
3.4.4. CD45	32
3.4.5. CD3	35
3.5. Wachstumsfaktor	37
3.5.1. Transforming growth factor (TGF- $\beta$ )	37
<b>4. Diskussion</b>	<b>39</b>
4.1. Von Hypertrophie bis Herzversagen	39
4.2. Zytoskelett	41
4.2.1. Desmin	42
4.3. Extrazelluläre Matrix	44
4.3.1. Fibronectin	46
4.3.2. Laminin	49
4.3.3. Kollagen I	51
4.3.4. Chondroitinsulfat	54
4.4. Adhäsionsmoleküle und Blutzellen	55
4.4.1. CD31 ( PECAM)	56
4.4.2. CD54 ( ICAM)	57
4.4.3. CD68	59
4.4.4. CD45	59
4.4.5. CD3	60
4.5. Wachstumsfaktoren	62
4.5.1. Transforming growth factor ( TGF- $\beta$ )	63

	<b>Seite</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6. Referenzen</b>	<b>69</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>89</b>
7.1.    Rezepte	89
7.2.    Abkürzungen	90
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>91</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>92</b>

# 1. Einleitung

Die Aortenstenose ist der bei Erwachsenen am häufigsten beobachtete Herzklappenfehler. Sie tritt normalerweise erst im hohen Alter auf und beruht auf degenerativen Klappenveränderungen. Die Verkalkung und Fibrose kann von den Aortenklappen auf benachbarte Herzstrukturen übergreifen und zu Veränderungen an der spezifischen Herzmuskulatur führen. Die hämodynamisch wirksame Aortenklappenstenose führt zur *konzentrischen Hypertrophie* der linken Kammer und zu einer poststenotischen Dilatation der Aorta ascendens und Zunahme des systolischen Drucks im linken Ventrikel.

Der myokardiale Sauerstoffverbrauch und damit -bedarf ist bei der Aortenstenose wegen der vergrößerten Muskelmasse, der erhöhten Druckentwicklung und der verlängerten Systolendauer des linken Ventrikels erhöht. So haben diese Patienten eine vermehrte Disposition zu Störungen der myokardialen Durchblutung. Wird das Herz wiederholt oder ständig einer erhöhten Arbeitsbelastung ausgesetzt, so treten strukturelle Veränderungen (Remodeling) auf. Diese führen durch Größenzunahme einzelner Zellen bei gleichbleibender Gesamtzellzahl zu einer pathologischen Vergrößerung des Organs. Bei der Herzhypertrophie werden 2 Formen unterschieden: Bei reiner Druckbelastung kommt es zunächst zur Hypertrophie der Ventrikelwand ohne nennenswerte Vergrößerung der Herzhöhle, wie bei der Hypertrophie des linken Ventrikels bei Aortenstenose. Beruht die Überbelastung dagegen auf einer vergrößerten Volumenleistung, so geht die Hypertrophie mit einer deutlichen Vergrößerung des Hohlraums (Dilatation) einher, zum Beispiel die Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels infolge einer Aortenklappeninsuffizienz. Die Möglichkeit der Kompensation solcher Störungen durch Strukturänderungen des Myokards ist jedoch begrenzt; denn mit der Zunahme des Faserradius werden gleichzeitig die Diffusionswege zwischen den Kapillaren und den Herzmuskelzellen größer, so daß die Gefahr einer ungenügenden O<sub>2</sub>-Versorgung entsteht. Bei einer Aortenklappenstenose besteht eine Diskrepanz zwischen dem normalen enddiastolischen Volumen und dem erhöhten enddiastolischen Druck, welcher infolge der verminderten Dehnbarkeit aufgrund der konzentrischen Hypertrophie zustande kommt<sup>1</sup>. Diese gestörte Dehnbarkeit führt zu einer diastolischen Dysfunktion.

Aortenstenose ist der häufigste Grund für diastolische Dysfunktion. Sie ist durch erhöhten Widerstand gegen die diastolische Füllung gekennzeichnet.

Folgende Störungen gehören zur diastolischen Dysfunktion: *Hypertrophie*, strukturelle Veränderungen des Myokards mit vermehrter Fibrose, myokardiale Vernarbungen oder infiltrative Prozesse. Diastolische Dysfunktion wurde bei etwa

50% der Patienten mit normaler systolischer Ejektions-Fraktion und bei allen (100%) Patienten mit erniedrigter oder eingeschränkter EF gefunden <sup>2</sup>.

Bei Aortenvitien ist die Myokardfunktion von dem Grad der Hypertrophie des linken Ventrikels abhängig. Das Herz kann eine Verdoppelung der Muskelmasse des linken Ventrikels mit normaler Reservefunktion kompensieren, bei weiterer Zunahme der Hypertrophie sinkt die Reservefunktion ab, und es kommt zur dekompenzierten Hypertrophie <sup>3</sup>.

Die Reaktion des Herzens auf eine zunehmende hämodynamische Belastung ist die Zunahme der Herzmasse. Diese Veränderung kann normalisiert und dadurch die Hypertrophie kompensiert werden, solange die hämodynamische Belastung noch nicht schwerwiegend und progressiv geworden ist <sup>4</sup>. Unter extremer Belastung entwickeln die Kardiomyozyten eine Hypertrophie. Diese umfaßt nicht nur die Vergrößerung der einzelnen Zellen sondern auch eine qualitative Veränderung der Proteinbestandteile wie z.B. die schweren Ketten des Myosin. Beide Veränderungen führen zu einer Kompensation des kardialen Überdrucks. Die Hypertrophie ist somit eine Art Anpassung des Herzens an den entwickelten Überdruck <sup>5</sup>.

Der erste Faktor, der zur Hypertrophie führt, ist die mechanische Anpassung des Herzens. Peterson konnte zeigen, daß die Anspannung der papillären Muskeln die Proteinsynthese beschleunigt <sup>6</sup>.

Im hypertrophierten Myokard werden verschiedene Veränderungen wie z.B. vaskuläre Versorgung <sup>7</sup>, degenerative Veränderungen in den Myozyten <sup>8</sup>, Expression fetaler Proteine <sup>9</sup>, Veränderung der Myosinisoenzyme <sup>10</sup>, und veränderte mechanische Eigenschaften der Muskeln <sup>11,12</sup> beobachtet. Jedoch scheinen diese Veränderungen nicht für die ausgeprägte Verschlechterung der kardialen Pumpenfunktion verantwortlich zu sein.

In den letzten Jahren ist versucht worden, den genauen Weg zu verstehen, der zur Hypertrophie des Herzens führt. So kommt es bei mechanischem Überdruck zu Signalen, welche molekulare Ereignisse zur Folge haben, die eine Zunahme der Zellgröße (Myozyten hypertrophie) und der Zellzahl (Myozytenproliferation) bewirken <sup>13</sup>. Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht die Wachstumsfaktoren, die für diese zelluläre Adaptation wichtig sind und ihre klinischen Anwendungen in der Behandlung des pathologischen Herzens zu identifizieren. Die Hemmung dieser Wachstumsfaktoren und somit die Begrenzung der Größenzunahme der Myozyten ist für die Entwicklung der ventrikulären Dysfunktion bei den meisten Herzerkrankungen von Bedeutung <sup>14-17</sup>.



Bei Fortdauer einer starken pathologischen Belastung kann es schließlich zum Herzversagen (Myokardinsuffizienz) kommen. So ist die Herzinsuffizienz die Folge von chronischen, meistens über viele Jahre bestehenden Herzerkrankungen wie unkorrigierte Klappenfehler, Hypertonie, dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie. Die charakteristischen Strukturveränderungen des insuffizienten Herzens sind sehr gut untersucht und beschrieben worden. Der Verlauf und besonders der Übergang von der kompensierten Herzhypertrophie zum Herzversagen ist immer noch unbekannt.

Diese Arbeit befaßt sich mit diesem Thema. Es wurden Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie aufgrund einer Aortenklappenstenose und Patienten mit Herzversagen infolge einer dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist, einen Zusammenhang zwischen der Entstehung und Ausbreitung der Fibrose, und anderen strukturellen Veränderungen, sowie dem Verteilungsgrad der verschiedenen Entzündungsparameter und Wachstumsfaktoren mit der zunehmenden Einschränkung der Herzfunktion im Verlauf der Hypertrophie bis zum Herzversagen zu finden.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. *Patientenpopulation***

Die hier untersuchten Gewebe stammen von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen:

1. 44 Patienten, die an einer lang bestehenden Aortenklappenstenose litten. Diese Patienten entwickelten aufgrund ihrer Aortenstenose eine Hypertrophie und in Folge davon eine linksventrikuläre Dysfunktion und unterzogen sich einer Klappenersatzoperation. Sie sind aufgrund ihrer präoperativen Ejektionsfraktion (EF) in drei Gruppen unterteilt worden.

Gruppe 1: EF  $\sim > 50\%$

Gruppe 2: EF  $\sim 30 - 50\%$

Gruppe 3: EF  $\sim < 30\%$

#### **Definition von Ejektionsfraktion(EF)**

Den Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Füllungsvolumen bezeichnet man als Auswurffraktion oder Ejektionsfraktion. Die Normalwerte liegen bei Menschen in Ruhe zwischen 50% und 70%. Die EF dient als Maß für die Kontraktilität des Herzens. Die Auswurffraktion kann mit Hilfe der Echokardiographie in Kombination mit der farbkodierten intrakardialen Doppleruntersuchung bestimmt werden. (Tabelle 1)

2. 12 Patienten, die infolge einer dilatativen Kardiomyopathie eine Herzinsuffizienz entwickelten und sich deshalb einer Herztransplantation unterziehen mußten. Das ventrikuläre Myokard wurde vom explantierten Herzen erhalten. Diese Patienten zeigten eine Ejektionsfraktion von unter 20%, und waren im Stadium IV der New-York-Heart-Association-Klassifikation (NYHA).
3. Als Kontrollgruppe wurde die Papillarmuskulatur von 6 Patienten mit Mitralklappenstenose und klinisch normalem linken Ventrikel, die sich einer Klappenersatzoperation unterzogen, untersucht.

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Patientenpopulation

Patienten	n	Alter [Jahre]	LVEDP [mmHg]	EF [%]	PCP [mmHg]
Kontrolle	6	51 ±	8 ± 2	60-70	12 ± 2
Gruppe 1	17	71 ±	15 ± 4	>50	16 ± 2
Gruppe 2	19	68 ±	22 ± 2	50-30	20 ± 4
Gruppe 3	8	70 ±	30 ± 4	<30	33 ± 8
DCM	12	48 ±	30 ± 3	<20	38 ± 7

*LVEDP: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck*

*EF: Ejektionsfraktion*

*PCP: pulmonaler Kapillardruck*

*DCM: dilatative Kardiomyopathie*

*Die hier aufgelisteten Werte sind Mittelwerte der klinischen Daten.*

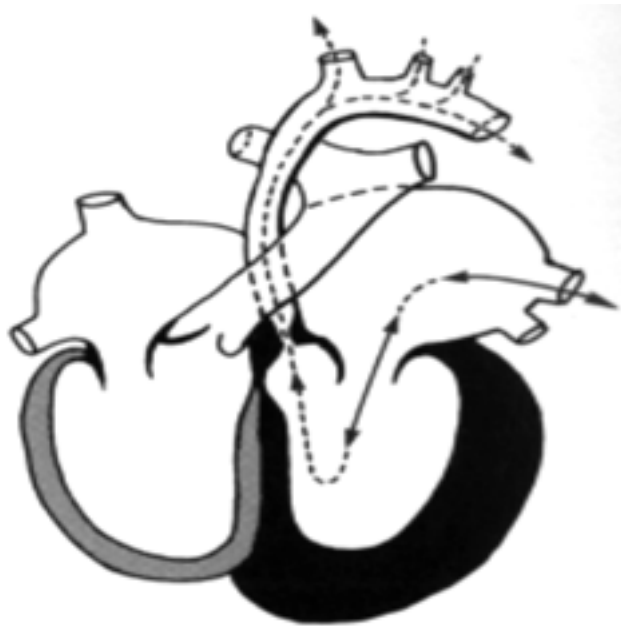
Alle Patienten wurden jahrelang mit Medikamenten wie z.B. ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker, und je nach Bedarf Diuretika, behandelt.

## 2.2. Gewebe

Bei den Patienten mit Aortenklappenstenose und unserer Kontrollgruppe wurden vom subvalvulären Septumbereich während der Operation Biopsien entnommen. Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff konserviert. Das Wasser, das beim Einfrieren in einen festen Aggregatzustand überführt wird, wird während des Trocknens unter Umgehung der flüssigen Phase entfernt. Mit dieser Methode wird das Gewebe gehärtet und entwässert, ohne seine morphologischen und chemischen Charakteristika zu verändern. Die weitere Lagerung erfolgte in geschlossenen Behältern bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Die Verkleinerung des Gewebes auf eine geeignete Probengröße wie sie für die Untersuchung benötigt wurde, erfolgte wiederum in flüssigem Stickstoff mit Hilfe zweier Zangen.

Bei den Patienten der DCM-Gruppe wurde das explantierte Herz sofort nach der Übergabe durch den Chirurgen im Operationssaal mit einem Skalpell zerteilt und die Proben vom linken Ventrikel in entsprechende Größen für Untersuchungen aufgearbeitet und wie oben beschrieben konserviert.



*Abb. 1 Schematische Darstellung des Herzens mit isolierten Aortenstenose.*

### **2.3. Mikrotomie**

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Proben mit Tissue-Tec (OCT Compound, Fa. Miles Inc., USA) auf vorher beschriftete Aluminiumzylinder aufgeblickt. Tissue-Tec besitzt eine Elastizität, die ähnlich dem Gewebe ist, und dient sowohl zur Fixierung der Proben als auch zum Schutz vor Erwärmung. Die Gefrierschnitte wurden in einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  mit einem Kryostat 1720 digital von der Fa. Leitz hergestellt. Die Schneidetemperatur im Kryostat betrug zwischen  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-25^{\circ}\text{C}$ . Die Schnitte wurden mit warmen Glasobjektträgern (Zimmertemperatur) aufgenommen, die vorher mit Gelatine oder Silikon beschichtet worden waren. Durch dieses Verfahren erreichten wir eine bessere Haftung und konnten eine Ablösung der Schnitte während der Inkubationschritte verhindern.

#### *Beschichten der Objektträger mit Silikon*

Nach der Entfettung mit Spüllösung Extran (Fa. Merck, Darmstadt) wurden die Objektträger mehrmals mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die Objektträger im Wärmeschrank bei einer Temperatur von  $+40^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert, damit sie ganz trocken waren.

### *Herstellung von Silikonlösung*

1. 200 ml reines Aceton
2. mit 4000 ml 2%ige 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (Sigma, St. Louis, USA) mischen
3. Aceton
4. Aceton
5. Destilliertes Wasser
6. Destilliertes Wasser

Die Objektträger wurden in jedes Becken etwa 5 sec. eingetaucht, und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

### *HE-Färbung*

Um einen Überblick zu haben, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, und unter dem Mikroskop die Schnittrichtung und die Schnittqualität beurteilt .

Die Objektträger wurden 10 Minuten lang in Hämalaun eingetaucht, dann unter fließendem Wasser gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest eingetaucht und 6 min mit Eosin gefärbt. Danach wurden sie sehr kurz in die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gebracht. Hierbei färben sich die Zellkerne bläulich und die Zellen rötlich.

## **2.4 Immunhistochemie**

Hier wurden mono- oder polyklonale Antikörper verwendet, mit denen man auf der Basis der Antigen-Antikörperreaktion nach anschließender Fluoreszenzmarkierung einzelne Proteine spezifisch darstellen kann. Der genaue Zeitablauf dieser Methode ist im folgenden Protokoll als Tabelle 2 aufgeführt.

## **2.5. Fixierung**

Die angefertigten Gefrierschnitte wurden 10 min luftgetrocknet, danach erfolgte eine Fixierung entweder mit reinem Aceton bei einer Temperatur von -20°C für etwa 10 min oder mit 4% igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur etwa 5 min.

*Tabelle 2: Allgemeines Protokoll zur immunhistochemischen Präparation*

1. Schneiden des gefrorenen Gewebes
2. 10 min lufttrocknen lassen
3. Fixierung mit      Para – Formaldehyd 4% für 5 min oder Aceton, rein, -20°C    für 10 min
4. Waschen in Phosphate Buffered Saline (PBS) 3 mal 3 min
5. Überschichten mit dem Primärantikörper für 1 Stunde, Raumtemperatur
6. Waschen in PBS 3X3min
7. Überschichten mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde, Raumtemperatur
8. Waschen in PBS 3X3 min
9. Überschichten mit Fluoreszein für 30 min Raumtemperatur
10. Waschen in PBS 3X3 min
11. Kernfärbung
12. waschen in PBS 3X5 min
13. Eindecken der Schnitte mit Mowiol

Nach Acetonfixierung wurden die Gefrierschnitte nochmals bei Raumtemperatur getrocknet, da Aceton nicht wasserlöslich ist. Anschließend wurden die Objektträger 3mal 10 min in PBS gewaschen.

#### *Zusammensetzung des PBS*

NaCl	137,0	mmol
KCl	2,7	mmol
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	mmol
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0	mmol
pH	7,35	

## **2.6. Erster Antikörper**

Nach dem Fixieren wurden die Schnitte mit den spezifischen Primärantikörpern in der jeweiligen Verdünnung beschichtet, wobei für jeden Schnitt etwa 30 µl von der Antikörperlösung benutzt wurde. Die verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle 3 zusammen gefasst.

*Tabelle 3: Erste Antikörper*

Antikörper gegen	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller	Klon
Desmin	Maus	1: 50	Sigma, St. Louis, USA	De10-5
Fibronektin	Kaninchen	1:100	ICN, Costa Mesa, USA	Poly- klonal
Laminin	Ratte	1:100	Immunotech, Marseille, Frankreich	4C12.8
Kollagen I	Maus	1:100	Sigma, St. Louis, USA	COL-1
Chondroitinsulfat	Maus	1:100	Sigma, St. Louis, USA	CS-56
CD68	Maus	1:50	DAKO A/S, Denmark	EBM11
CD45	Maus	1:50	DAKOPATTS a/s, Denmark	Dako-LC
CD31 (PECAM)	Maus	1:50	DAKO A/S, Denmark	JC/70A
CD54 (ICAM)	Maus	1:10	Dianova, Hamburg, BRD	84H10
CD3	Maus	1:50	DAKOPATTS a/s, Denmark	T3-4B5
TGF- $\beta_1$	Maus	1:100	R & D Systems	9016.2

Nach dem Auftragen des 1. Antikörper erfolgte eine einstündige Inkubation in der feuchten, lichtdichten Kammer bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger in PBS-Puffer jeweils drei Mal für 3 min gründlich gewaschen bevor dann der zweite Antikörper aufgetragen wurde.

## **2.7. Zweiter Antikörper**

Die zweiten Antikörper sind mit Biotin (Vitamin H) gekoppelt und gegen die spezifischen Wirtsantigene der ersten Antikörper gerichtet.

Die Inkubationszeit mit dem zweitem Antikörper beträgt eine Stunde in gleicher Kammer bei Raumtemperatur.

## **2.8. Fluorochrom**

Wir verwendeten als Fluorochrom Streptavidin – Fluoroisothiocyanat (Streptavidin FITC, Fa. Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien).



*Tabelle 4: Zweiter Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Wirtstier</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Kaninchen	Esel	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Maus	Esel	1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Ratte	Schaf	1:100	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien

Streptavidin ist ein Protein von *Streptomyces Avidini*. Streptavidin bildet mit dem Biotin, das an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, einen stöchiometrischen Komplex. Es hat seinen isoelektrischen Punkt im pH neutralen Bereich und enthält keine Kohlenhydrate, deshalb ist es weniger anfällig für unspezifische Bindungen. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS haben wir das Streptavidin in einer Verdünnung von 1:100 (in PBS) auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug hier 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur, und danach wieder 3 x 3 minütiges Waschen in PBS.

## **2.9. Kernfärbung**

Die Kernfärbung erfolgte mit 7-Aminoactinomycin D (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA), das in PBS auf 1:100 verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten in der lichtdichten und feuchten Kammer.

Actinomycin ist ein Chemotherapeutikum, daß sich fest an den DNA-Doppelstrang anheftet. Bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Kerne rot angefärbt.

## **2.10. Eindecken**

Vor dem Eindecken wurden die fertig gefärbten Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Als Eindeckmedium wurde Mowiol (Fa. Hoechst, Frankfurt) verwendet. Dabei wurde Mowiol auf die Deckgläser aufgetragen und diese dann auf die feuchten Objektträger aufgelegt. Es durfte keine Bläschen unter dem Deckglas bleiben.

Mowiol besitzt einen geringen Fluoreszenzeffekt und ist deshalb gut für Fluoreszenzmikroskopie geeignet .

### *Herstellung von Mowiol*

1 g Mowiol wird in 4 ml PBS (pH 8,0) gelöst. Mowiol ist sehr schwer löslich und muß deswegen 16 Stunden gerührt werden.

Nach Zugabe von 2 ml wasserfreiem Glycerin muß erneut 16 Stunden gerührt und danach 15 min bei 12000 RPM zentrifugiert werden.

## **2.11. Kontrolle**

Als Negativkontrolle haben wir Schnitte benutzt, auf die der erste Antikörper nicht aufgetragen wurde, sondern die nur mit ausreichender Menge PBS eine Stunde lang inkubiert wurde. Dadurch konnten wir unspezifische Bindungen der II. und III. Antikörper ausschließen.

Die Gefrierschnitte wurden sowohl mit dem einfachen Fluoreszenz- als auch mit dem konfokalen Mikroskop untersucht.

## **2.12. Fluoreszenzmikroskopie**

Es wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Leitz gearbeitet. Die folgenden Immersionsobjektive wurden benutzt: PL APO 40x/1.00 Oil, PL 100x/1.32 Oil, PL APO 40x/0,75 und PL 25x/0,50.

Immunhistochemisch markierte Strukturen können mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Fluoreszierende Farbstoffe, die an Antikörper gebunden sind, werden mit Licht einer speziellen Wellenlänge zum Leuchten angeregt. Als Lichtquelle wird eine Quecksilberdampf Lampe benutzt.

Wir haben hier die Strahlung einer 100 Watt Quecksilberdampf Lampe durch Filter spezifischer Wellenlängenbereiche von oben auf unsere Schnitte geleitet. Durch die Strahlengang von Fluoreszenzmikroskop kann nur Blaulicht mit einer Wellenlänge von 450 bis 490 nm hindurchtreten. Der strahlenteilende Spiegel reflektiert Licht unterhalb 510 nm nach unten, aber läßt Licht oberhalb von 510 nm durch. Das zweite Sperrfilter: Verhindert den Durchtritt unerwünschter Fluoreszenzsignale, aber läßt die spezifische grüne Fluoreszenzemission zwischen 520 und 560 nm passieren. So konnten wir die markierten Strukturen sichtbar machen.

## 2.13. Konfokale Mikroskopie

Professor Marvin Minsky entdeckte schon 1961 das Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Er entwickelte ein Mikroskop, mit dem man relativ scharfe Bilder von dicken Präparaten fertigen konnte ohne sie in dünne Schnitte zu schneiden.

Betrachtet man in einem normalen Mikroskop ein dickes Präparat, in dem man einzelne Schichten fokussiert, ist es nicht möglich, diffuse Reflexionen, die durch nicht in dieser Fokusebene liegende Gewebsschichten verursacht werden, auszuschalten.

Diese Reflexionen haben entweder ein unscharfes Bild zur Folge oder sind so stark, daß sie das von der Schärfeebene kommende Licht überstrahlen und den Kontrast herabsetzen. Deshalb wurde das Mikroskop so verändert, daß nur Licht aus der eingestellten Ebene eingefangen und so das Streulicht verhindert wurde. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wird das zur Anregung der Fluoreszenz verwendete Licht, in diesem Fall ein Laser, über einen Spiegel in das Objektiv und von dort aus in die gewünschte Ebene des Präparates geleitet. Anschließend wird das emittierte Licht wieder vom Objektiv eingefangen, um durch eine Lochblende auf den dahinter liegenden Detektor zu treffen. Diese Lochblende minimiert die Reflexionen des Gewebes, die oberhalb und unterhalb der Fokusebene im Strahlengang liegen. Dadurch erreicht das gesamte reflektierte Licht ohne zu Streuen den Detektor, und das Bild gewinnt an Schärfe. Der Detektor besteht aus einem Photomultiplier und setzt das Erfasste in elektrische Signale um, die auf dem Bildschirm erkannt werden <sup>18</sup>(Abb.2).

Mit einem konfokalen Lasermikroskop ist es möglich, die so gewonnenen Bilder digital zu verarbeiten und zu speichern (Leica TCS SP). Im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop wird hier das Strahlenbündel einer Laserlampe nicht durch Filter geleitet, sondern erst in einem Prisma aufgetrennt und dann durch eine Blende der Wellenlängenbereich eingegrenzt. Bei unserem konfokalen Mikroskop ist es möglich, schon im vornherein durch die Wahl des Lasers das Spektrum einzuschränken. Wir hatten die Möglichkeit zwischen einem Argon-, einem Krypton- bzw. einem Helium-Neon-Laser zu wählen. Die Hauptspektren der Laser teilen sich wie folgt auf:

Krypton	→	488 nm
Argon	→	458 nm
Helium-Neon	→	568 - 633 nm

In der nachfolgenden Tabelle sind die von uns verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zusammen mit der Wellenlänge ihres Anregungsbereiches aufgeführt.

Tabelle 5 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge in nm des Anregungsbereiches
FITC	494
CY 2	489
CY 3	550

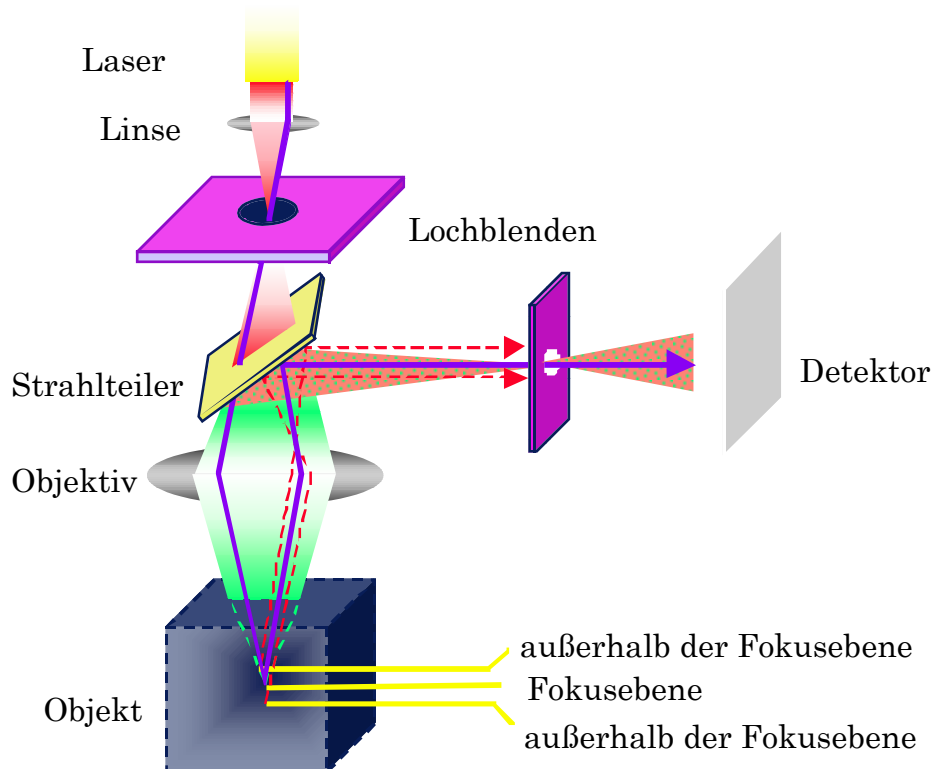


Abb.2 Das konfokale Prinzip:

Laserstrahlen werden mit einer Linse in die Öffnung einer Lochblende fokussiert. Mit Hilfe eines Spiegels werden sie in das Objektiv weitergeleitet, welches sie auf einen Punkt in der gewünschten Tiefe des Präparats bündelt. Das vom Präparat emittierte Licht wird vom Objektiv erfasst und durch den Strahlteilerspiegel auf die Öffnung einer Lochblende fokussiert, hinter der sich der Detektor befindet. Die Vorrichtung für die Rasterung ist nicht dargestellt. Die Lochblende schirmt Strahlen, die von höher (rot) oder tiefer (gelb) gelegenen Schichten kommen, zum größten Teil ab.

## 2.14. Dokumentation

Zur Dokumentation benutzen wir eine Kamera, die am Mikroskop befestigt ist; zum Fotografieren verwendeten wir Kodak Elite Diafilme mit einer Lichtempfindlichkeit von ASA 200. Die Vergrößerung auf Papier betrug je nach Feldvergrößerung 500, 660, 800 oder 1000 fach. Die benötigten Belichtungszeiten

lagen zwischen 5 und 200 sec., je nach Präparat und Antikörper. Am konfokalen Lasermikroskop wurden nur Filme mit der Empfindlichkeit 100 ASA verwendet.

## **2.15. Bildverarbeitung**

Die digitale Bildverarbeitung erlaubt eine standardisierte Bildanalyse. Die Rohdaten der Bilder, die am konfokalen Mikroskop gefertigt wurden, wurden über Ethernet-Netzverbindung auf eine INDY®-Workstation (Fa. Silicon Graphics, USA) transferiert. Hier wurde mit dem Programm IMARIS® (Fa. Bitplane, Schweiz) die Bildverarbeitung weiter durchgeführt, wie zum Beispiel Kontrasterhöhung, Rauschunterdrückung oder eine dreidimensionale Rekonstruktion.

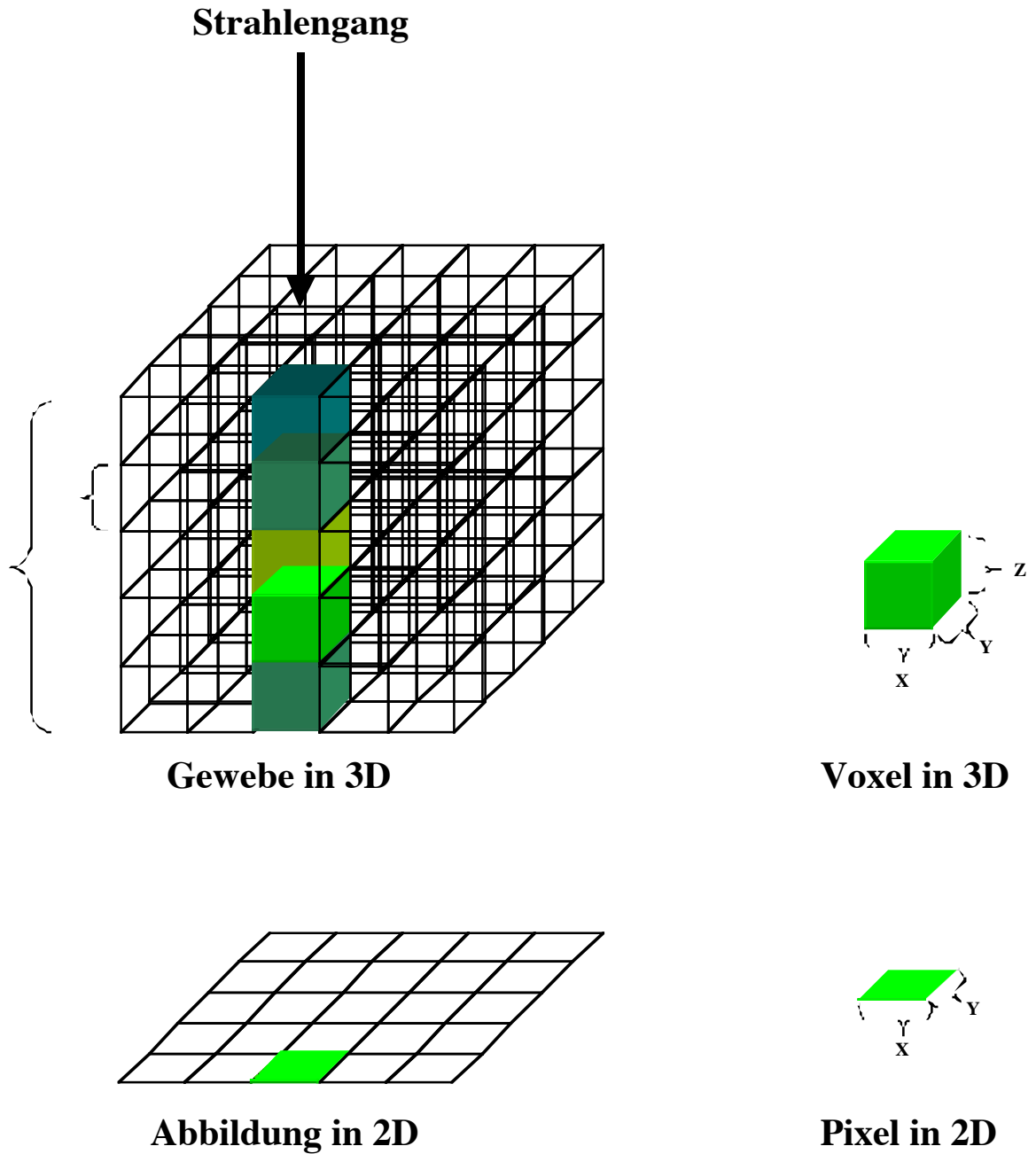
Um die Fülle der Daten verwalten zu können, wurde das Programm SELIMA® (Fa. Bitplane, Schweiz) verwandt, wodurch es möglich wurde, die Rohdaten auf Festplatte oder mit Hilfe eines externen Magneto Optical Disk Laufwerks (Fa. Pinnacle Micro, USA) zu speichern.

Um die gewählten Bilder auf Diapositive zu belichten, verwandten wir einen, an die INDY® angeschlossenen Computer Quadra 700 (Fa. Apple Macintosh, USA) und einen Belichter LFR Mark II (Fa. Lasergraphics, USA).

Während der Rasterung des Präparats in der Z-Ebene (Tiefe) entsteht ein Stapel von Schichtbildern. Diese optischen Schnitte werden als digitalisierte Datensätze auf die Indy-Workstation übertragen. Die durch die drei räumlichen Koordinaten (x, y und z) bezeichneten Bildelemente eines Objektvolumens nennt man Voxel in Anlehnung an Pixel (picture elements) einer zweidimensionalen Abbildung. Das Programm 'Imaris' ermöglicht durch Verarbeitung des Voxel-Datensatzes die dreidimensionale Darstellung des untersuchten Präparats. Diese räumliche Darstellung ist beliebig drehbar und mit Hilfe von optischen Schnitten (Quer- und Längsschnitte) von allen Seiten für den Betrachter zugänglich. (Abb. 3)

Eine andere Möglichkeit der Bilddokumentation bietet der sogenannte 'extended focus'. Es handelt sich hierbei um eine Maximumprojektion aller aufgenommenen Schnitte eines Präparats in einer zweidimensionalen Darstellung, wobei für jede xy-Koordinate der jeweils größte Helligkeitswert aus allen Schnitten ausgewählt wird. Fluoreszenzpunkte aus unterschiedlichen Ebenen des Präparats werden somit nebeneinander projiziert.

Im Programm 'Selima' werden die erstellten Bilder gespeichert und dokumentiert. Die Bilder wurden mit den Graphikprogrammen Adobe® Illustrator und Adobe® Photoshop weiterbearbeitet und mit einem Tintenstrahldrucker (Epson) ausgedruckt.



*Abb.3: Schematische Darstellung und Definitionen von Pixel und Voxel.  
Pixel (picture & element) ist das kleinste, nicht mehr unterteilbare Bildelement in einem zweidimensionalen System.  
Voxel (Volume & Pixel) ist das kleinste, nicht mehr unterteilbare Volumenelement in einem dreidimensionalen System.*

## 2.16. Fluoreszenzintensität

Die Messungen der Fluoreszenzintensität wurden mit dem Quantify Modus der Software von Leica (TCS NT, Version 1.6.587) durchgeführt. Hierbei misst das Programm die Helligkeit der einzelnen Bildpunkte auf einer Skala von 0 bis 255.

Dies entspricht der Grauwerteskala. Durch unsere Grundeinstellungen lagen die Messungen alle in diesem Bereich.

Die Gesamtintensität errechnet sich dann aus der Summe der Intensitätsstufen, jeweils multipliziert mit der Anzahl der Bildpunkte dieser Intensität. Das Programm bezieht dann die Gesamtintensität auf die Anzahl der umfahrenen Bildpunkte, so daß wir eine Durchschnittsintensität für einen Schnitt bekamen, mit entsprechender Standardabweichung und der dazugehörigen Flächenangabe.

## **2.17. Morphometrie**

Zum Zählen haben wir unsere Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Objektiv PL 25x/0,5) scharf eingestellt. Die Feldvergrößerung, die hier benutzt wurde, betrug 1,25x.

Dabei haben wir ein Zählgitter mit 11 Spalten und 11 Zeilen benutzt, dessen Gesamtgröße 1 mm<sup>2</sup> beträgt (Punktzählverfahren).

Auf jedem Schnitt haben wir mindestens 5 Gesichtsfelder zufällig ausgewählt, dabei wurde darauf geachtet, daß die histologischen Qualitätsmerkmale vorhanden waren.

Es durften keine Artefakte, wie Kratzer, Temperaturschäden am Gewebe, Fixierungsschäden oder unzureichende immunhistochemische Färbung vorhanden sein.

Abhängig von der Zählmethode mußten wir unserer Ergebnisse entweder in Prozent ( bei Fibronectin, Kollagen I) oder in n/mm<sup>2</sup> umrechnen.

Bei Fibronectin und Kollagen I (Fibrosegrad) wurden die Schnittpunkte der Zählgitterlinien, die auf dem Fluoreszenz-markierten Protein lagen, gezählt. Bei der Zählung wurden zwei Seiten des Gitterrandes mitgezählt. Insgesamt hatten wir 121 Schnittpunkte.

Bei den Blutzellen und Adhäsionsmolekülen wurden die positiv markierten Zellen pro Gesichtsfeld gezählt und dann in n/mm<sup>2</sup> Fläche umgerechnet.

## **2.18. Myozytengröße**

Zur Bestimmung der Myozytengröße haben wir Myozyten in Querschnitt ausgesucht. Die Querschnitt wurde in höhe der Kerne mit dem 40x Objektiv erfaßt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (Leica TCS 4D) und der

integrierten Software LEICA SCANware 05.1b. Die Daten wurden in das Programm Macintosh Excel überführt, und die statistische Analyse wurde mit ANOVA und Bonferroni's Multiplen Vergleichstest durchgeführt. Pro Patient hatten wir etwa 20 Zellen ausgewählt und die Größe in  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Dann wurde die durchschnittliche Gesamtzellfläche pro Patient und am Ende das Mittelwert pro Gruppe ausgerechnet. Mittelwerte der Gesamtzellflächen der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen. Die statistische Analyse wurde im Kapitel Ergebnisse beschrieben.



### 3. Ergebnisse

Das Myokard besteht aus Herzmuskelzellen, die untereinander verbundene Stränge und Bündel bilden. Diese verlaufen in den Kammerwänden in verwickelten Spiralen, so daß sich in histologischen Präparaten ein Schichtenbau erkennen läßt, wobei lockeres Bindegewebe die einzelnen Schichten voneinander trennt.

#### 3.1. Myozytengröße

Die Myozyten der hier untersuchten Gewebe (Gruppe 1 - 3) waren von unterschiedlicher Größe, viele waren hypertrophiert, andere atrophiert, aber ein größerer Prozentsatz war auch von normaler Größe. Die Zellgrößen wurden hier in  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Wir haben die hypertrophierten Gruppen mit Kontrollgruppe verglichen und fanden, daß die Zellen in Gruppe 1 und Kontrolle gleich Groß waren. Dies ist sehr interessant, daß in der Gruppe 1, obwohl wir eine deutliche Fibrose beobachten konnten, die Zellgrößen noch die von gesunden Geweben entsprachen.

In Gruppe 2 und 3 waren die Zellgrößen in Vergleich zu Kontrolle und Gruppe 1 signifikant zugenommen ( $p < 0.05$ ). (Abb. 4)

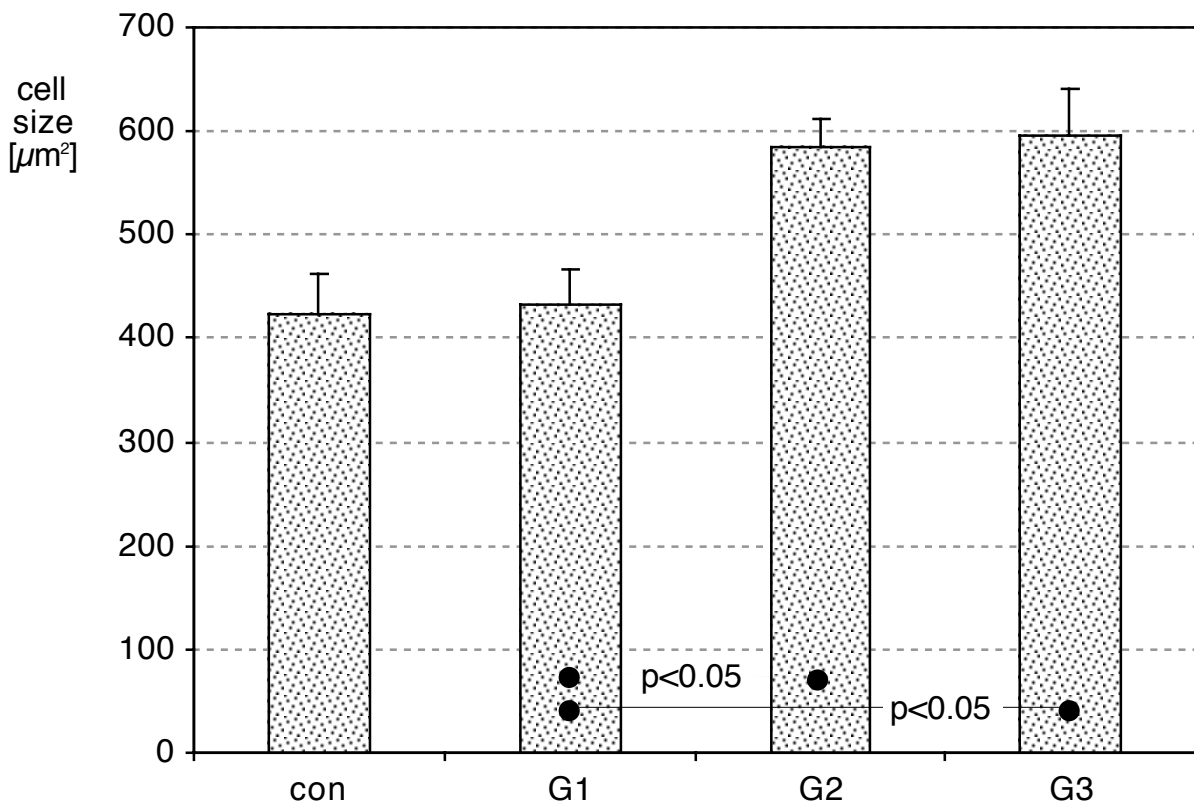


Abb. 4: Myozytendurchmesser innerhalb der verschiedenen Untersuchungsgruppen

Die Septen des Interstitiums zwischen den Myozyten waren bei unseren Gruppen verbreitert, und zahlreiche einzelne Myozyten wurden durch die Fibrose voneinander isoliert. Die Querstreifung schien hier reduziert zu sein. Das ist ein Hinweis auf Abnahme des kontraktiven Materials und dies deutete auf intrazelluläre Degeneration. Diese Beobachtung wurde näher untersucht mit Antikörper gegen Desmin wie unten beschrieben.

### **3.2. Zytoskelettäres Protein: Desmin**

Desmin ist das wichtigste Intermediärfilament der quergestreiften Muskelzelle und ein wichtiger Stabilisator der Sarkomerstruktur. Die Markierung für Desmin findet sich im Z-Streifen und im Glanzstreifen. Im normalen Herzmuskel zeigt die Desminfärbung in der Immunfluoreszenz eine gleichmäßige Querstreifung.

Im hier untersuchten Gewebe mit dilatativer Kardiomyopathie (Gruppe DCM) dagegen war Desmin in vielen Myozyten desorganisiert und akkumuliert. Die gleichmäßige Querstreifung fehlte hier. Bei Gruppe 1 konnten wir an manchen Stellen eine Reduktion der sonst gleichmäßigen Querstreifung feststellen. Bei Gruppe 2 hatte die regelmäßige Querstreifung im Vergleich zu der Kontrollgruppe und Gruppe 1 deutlich abgenommen und in Gruppe 3 war die Desorganisierung der Desminfärbung am stärksten (Abb. 5).

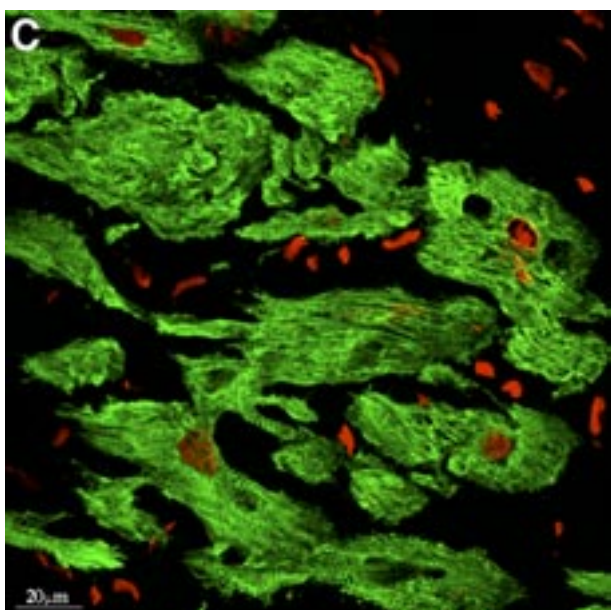
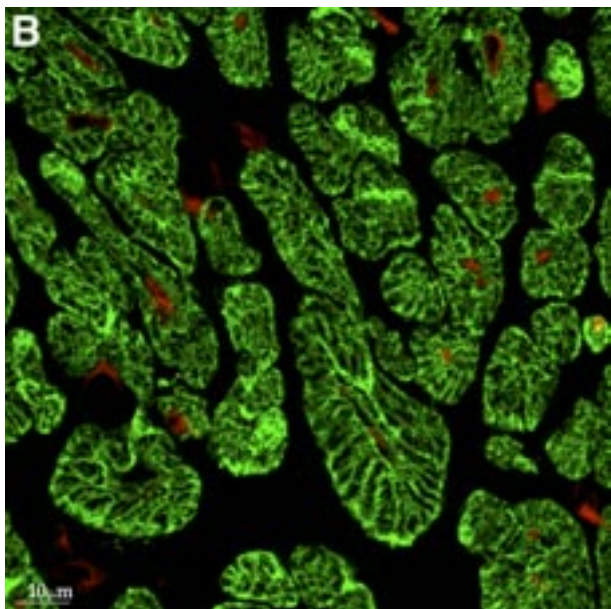
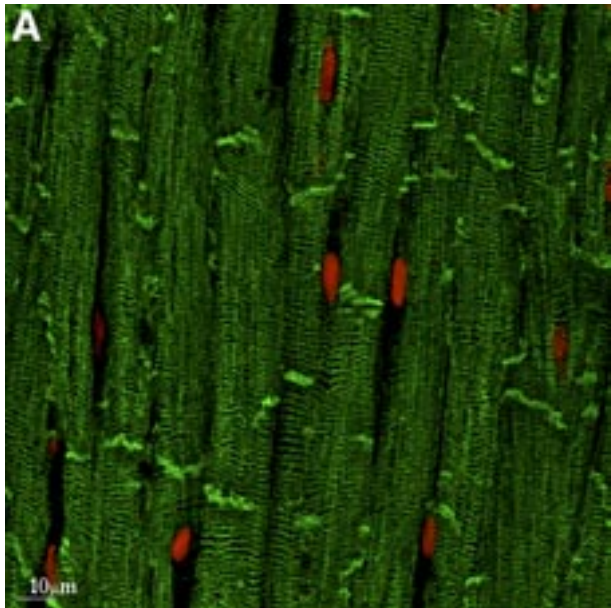
Die besondere Fragestellung dieser Arbeit bezog sich jedoch auf die Veränderungen der extrazellulären Matrix, die im folgenden beschrieben wird.

### **3.3 Extrazelluläre Matrix**

Wir haben die Verteilung von Fibronectin, Laminin, Kollagen I, und Chondroitinsulfat in den drei Gruppen der Aortenklappenstenosepatienten im Vergleich zu Gewebe von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und der Kontrollgruppe (Patienten mit Mitralstenose) untersucht.

#### **3.3.1. Fibronectin**

Die Untersuchung von Fibronectin wurde zum einen qualitativ und zum anderen quantitativ durchgeführt.



**Abb. 5:**

*Immunhistochemische Darstellung mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops von **Desmin** in menschlichen Herzmuskel. Hier ist die spezifische Fluoreszenz grün, die Kerne sind rot.*

**(A) Kontrollgewebe**

*Im Kontrollgewebe fällt zunächst die starke Fluoreszenz der Glanzstreifen auf. Desweiteren sieht man intrazelluläre Markierungen mit paralleler Ausrichtungen, die zueinander in etwa gleichem Abstand vorkommen. Insgesamt sind die Querstreifung hier sehr regelmäßig.*

**(B) Hypertrophie**

*Im hypertrophierten Gewebe ist die Querstreifung gestört. Desmin ist in manchen Stellen akkumuliert und die Zellen sind irregulär geförmt.*

**(C) DCM**

*Die starke Fluoreszenz der Glanzstreifen und die interazelluläre Markierungen fehlen teilweise vollständig. Die regelmäßige Querstreifung weist deutliche Defekte auf. Kleine, abgerundete Myozyten überwiegen bei insgesamt aufgelöstem Zellverband. Der Extrazellulärraum ist deutlich verbreitet.*

### *Qualitativ*

Fibronektin ist ein Protein der Extrazellulären Matrix, das in der Basalmembran der Endothelzellen, Kapillaren und Myozyten gefunden wird. Es ist außerdem im interstitiellen Raum als Matrixprotein vorhanden, in dem andere Proteine wie z.B. Kollagenfibrillen eingebettet sind. Nach genauer Betrachtung von immunhistochemisch markierten Schnitten, fiel auf, daß an manchen Stellen Fibronektin positive Strukturen sich scheinbar intrazellulär befinden.

Diese Markierungen entsprechen jedoch eigentlich der ECM, in den T-Tubuli und liegen daher extrazellulär.

In gesundem Herzgewebe zeigte Fibronektin eine gleichmäßige Verteilung und seine Expression war mäßig. Beim Vergleich verschiedener Gewebsschnitte unserer Untersuchungsgruppen konnten wir feststellen, daß die Expression im erweiterten Interstitium der Gruppe 3 am stärksten war. Die Expression in Gruppe 1 und 2 schien fast gleich, jedoch deutlich intensiver als bei der Kontrollgruppe. Im Interstitium der DCM-Gruppe war sie ebenfalls intensiver als bei unserer Kontrollgruppe (Abb. 6).

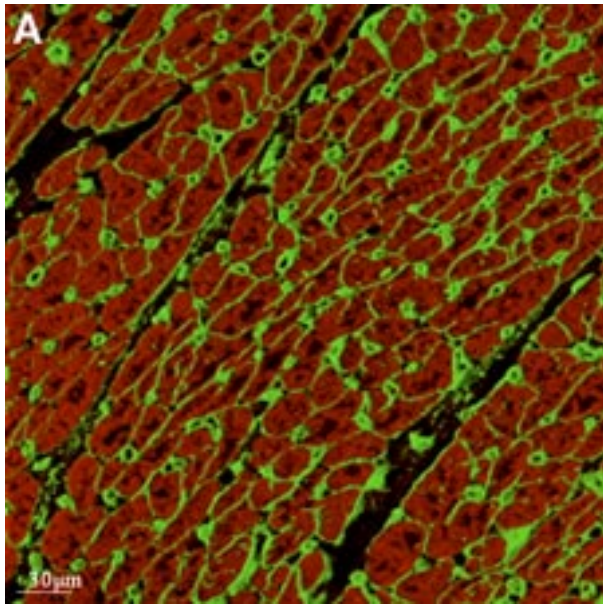
### *Quantitativ*

Fibronektin wurde als Maß für Fibrose quantitativ ausgewertet.

Wir haben bei jedem Patient die Linienschnittpunkte des Zählgitters in 5 ausgewählten Gesichtsfeldern über markiertem Fibronektin gezählt und das Ergebnis in Prozent umgerechnet. Damit ist der gesamte extrazelluläre Raum einschließlich der Gefäße erfasst worden.

Wir haben festgestellt, daß die Fibrose bei Patienten mit langjähriger Aortenstenose (Gruppe 1-3) und DCM im Vergleich zu den Kontrollen signifikant anstieg. Besonders interessant war, daß eine deutliche Fibrose schon bei der ersten Gruppe auftrat, obwohl diese Patienten immer noch eine normale Ejektionsfraktion hatten, und die Gruppe 1 und 2 praktisch keinen Unterschied zeigten. Abbildung 7 zeigt unsere Daten in Bezug auf Fibronektin.





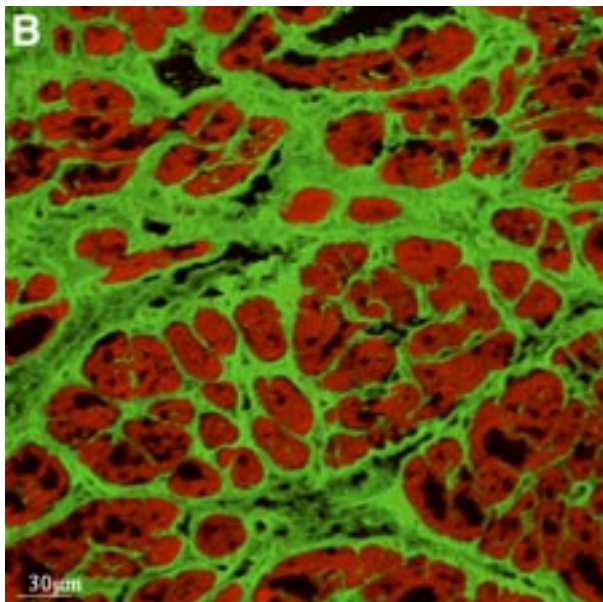
**Abb. 6:**

*Immunhistochemische Markierung für **Fibronektin** in menschlichen Myokard.*

*Die spezifische Fluoreszenz ist grün.*

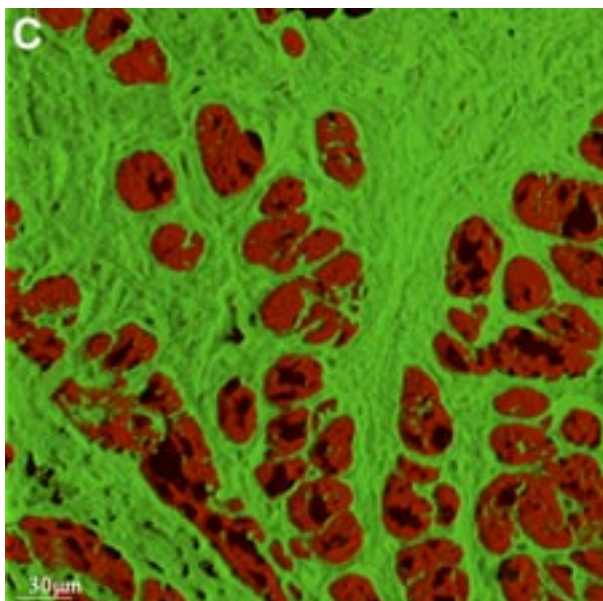
**(A) Kontrollgruppe:**

*Das gesunde Myokard zeigt Fibronektin als feine Strukturen, die die Myozyten und Kapillaren umgeben. Es fällt auf, daß Fibronektin an manchen Stellen intrazellulär lokalisiert ist. Dies kommt durch Färbung der T-Tubuli zustande. Hier zeigt Fibronektin eine gleichmäßige Verteilung und seine Expression ist mäßig. Der Zellverbund ist erhalten, und die Größe der Myozyten variiert nur gering. Zahlreiche Blutgefäße sind markiert.*



**(B) Hypertrophierte Gruppe:**

*Hier kommt es durch Anhäufung und Vermehrung von Fibronektin zu einer Verbreiterung des Extrazellulärtraumes. Abhängig von der Größe dieser inhomogen wirkenden Areale kommt es zur partiellen Auflösung des Zellverbundes, die in der schwersten Form zu einer Isolierung der Myozyten führt.*



**(C) DCM-Gruppe:**

*Eine deutliche Zunahme an Fibronektin ist sichtbar. Die Vermehrung von Fibrose führt zu einer Auflösung des Zellverbandes. Es finden sich einzelne Myozyten, die durch die extrazelluläre Matrix voneinander getrennt sind. Hier findet man Myozyten mit unterschiedlicher Form und Größe. Die Anzahl der Blutgefäße ist deutlich zurückgegangen. An manchen Stellen fehlen Färbungen im intrazellulären Raum.*

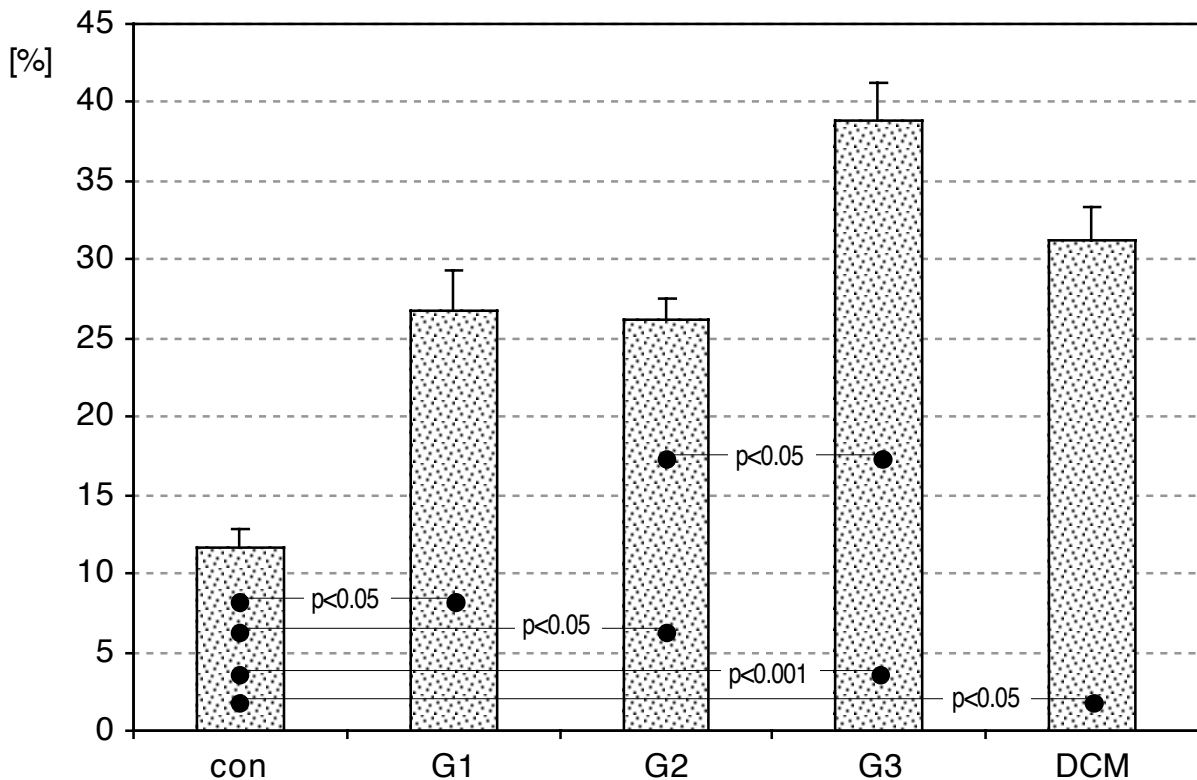
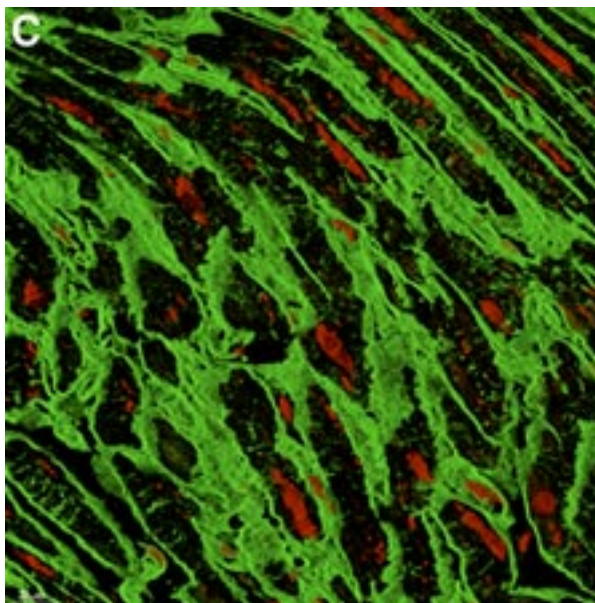
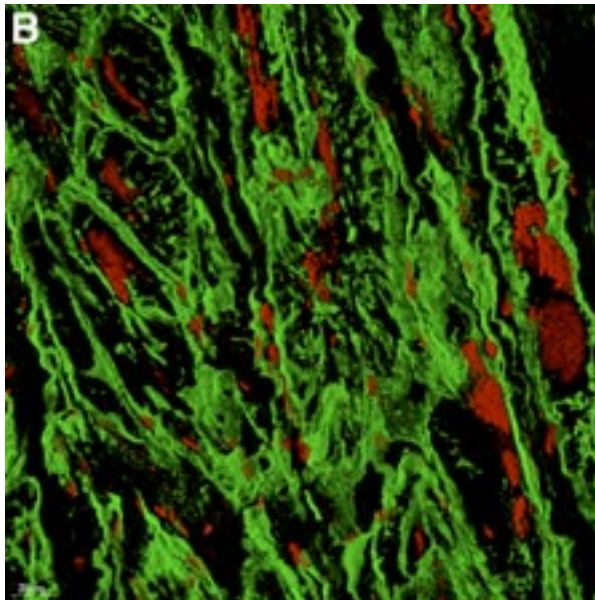
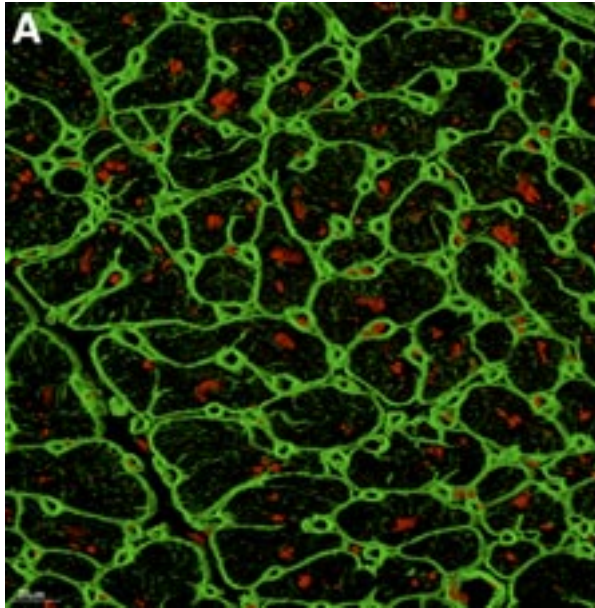


Abb. 7 Quantitative Messung von Fibronectin als Maß für die Fibrose.

### 3.3.2. Laminin

Laminin ist ebenfalls wie Fibronectin ein Protein der Extrazellulären Matrix. Dieses Glykoprotein ist ein Bestandteil der Basalmembran, und umgibt die Myokard-, Endothel- und glatten Muskelzellen. Die Darstellung durch einen monoklonalen Antikörper ermöglicht eine Aussage über die Integrität der Basalmembran und den Zellverband. Im Kontrollgewebe zeigte sich Laminin als eine dünne Begrenzungslinie um die Myozyten. Größere Konturunterbrechungen im Sinne eines Basalmembrandefektes waren nicht ersichtlich. Bei der intrazellulären Markierung der Myozyten, die sich gelegentlich bis an die Basalmembran verfolgen lassen, handelt es sich um die T-Tubuli. Diese haben als Einstülpungen der Basalmembran für die Erregungsleitung wichtige Funktionen. In den Untersuchungsgruppen war die Expression von Laminin erhöht und die ECM sah verbreitert aus. Auch war die enthaltene intrazelluläre Markierung, die den Ausläufern des T-Systems entspricht, teilweise ungeordnet und unregelmäßig.(Abb. 8)





**Abb.8:** Immunhistochemische Markierung für **Lamininn** in menschlichem Myokard. Die spezifische Fluoreszenz ist grün.

**(A) Kontrollgruppe:**

Im Kontrollgewebe zeigt sich Laminin als eine dünne Begrenzungslinie um die Myozyten. Die Konturen um Myozyten sind kontinuierlich und ohne Unterbrechung. Bei der intrazellulären Markierung der Myozyten, die sich gelegentlich bis an die Basalmembran verfolgen lassen, handelt es sich um die T-Tubuli. Der Extrazellulärraum ist überwiegend schmal, einzelne Blutgefäße durch Markierung der Basalmembran sind zu sehen. Zellverband ist erhalten. Die Myozytengröße variiert wenig.

**(B) Hypertrophierte Gruppe:**

Die Expression von Laminin ist erhöht und die ECM sieht verbreitert aus. Der Zellverbund ist in manchen Stellen aufgelöst. Die Myozyten sind unterschiedlich groß. Die intrazelluläre Markierungen sind in manche Myozyten nicht mehr vorhanden. An einzelnen Zellen sind die Konturenunterbrechungen von Basalmembran vorhanden.

**(C) DCM-Gruppe:**

Im insuffizienten Herz ist die Lamininexpression stark zugenommen. Der Zellverbund ist teilweise aufgelöst, es finden sich kleine Gruppen von Zellen, die durch verbreiteten Extrazellulärraum voneinander getrennt sind. In manche Myozyten sind die Basalmembran nicht mehr Intakt und die Konturenunterbrechungen fällt häufiger auf. Der Auflösung der Basalmembran geht mit dem Verlust der T-Tubuli einher, sodaß ab einer bestimmten Schwere der Schädigung eine intrazelluläre Markierung fehlt.

### 3.3.3. Kollagen I

Kollagen I ist der häufigste Kollagentyp des menschlichen Körpers. Die Mikrofibrillen haben einen Durchmesser zwischen 20 nm und 100 nm. Sie kommen in der Extrazellulären Matrix vor und wurden ebenfalls als Maß der Fibrose, ähnlich dem Fibronectin, untersucht. Wir haben das immunhistochemisch spezifisch markierte Kollagen I in 5 verschiedenen Gesichtsfeldern mit Hilfe des Zählgitters gezählt und das Ergebnis in Prozent umgerechnet (Abb. 9). Die Ergebnisse dieser Auszählungen waren mit denen von Fibronectin vergleichbar. Der Unterschied hier war jedoch, daß sowohl der Expression von Kollagen I im Intestitium, als auch die gezählten Schnittpunkte niedriger als bei Fibronectin waren. Abb. 10 zeigt die immunhistochemische Darstellungen von Kollagen I in verschiedenen Untersuchungsgewebe.

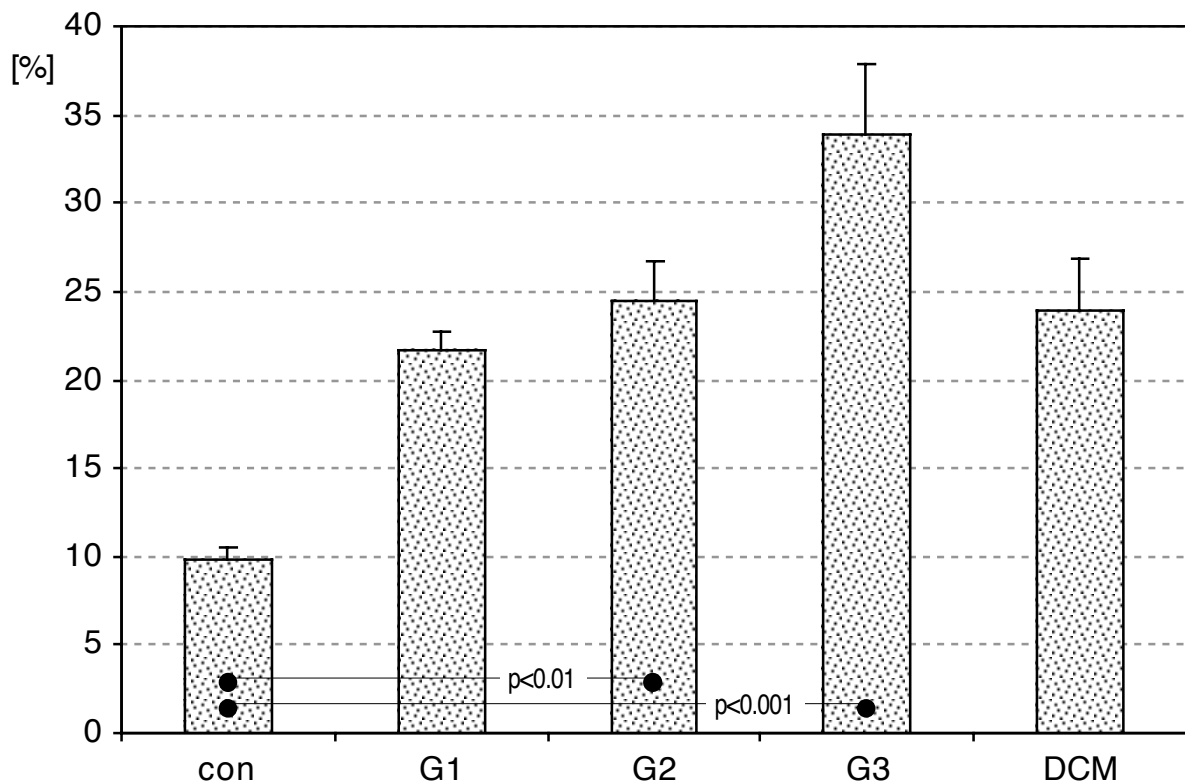
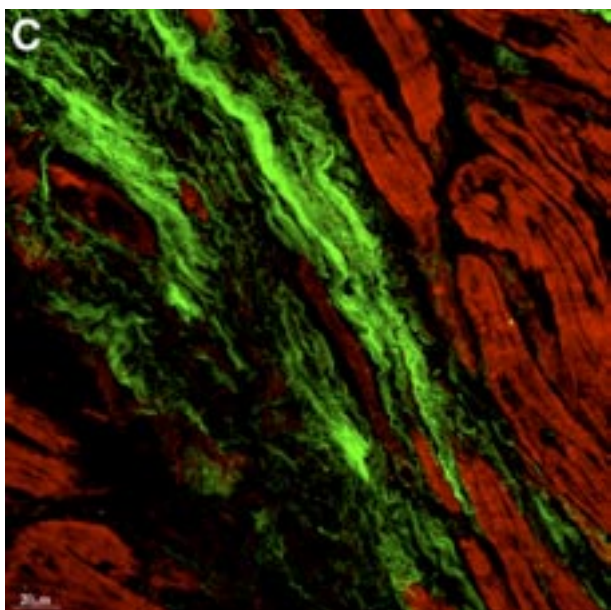
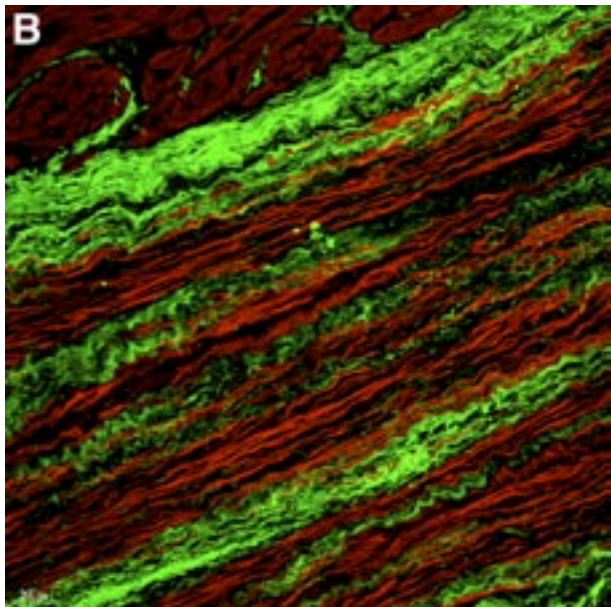
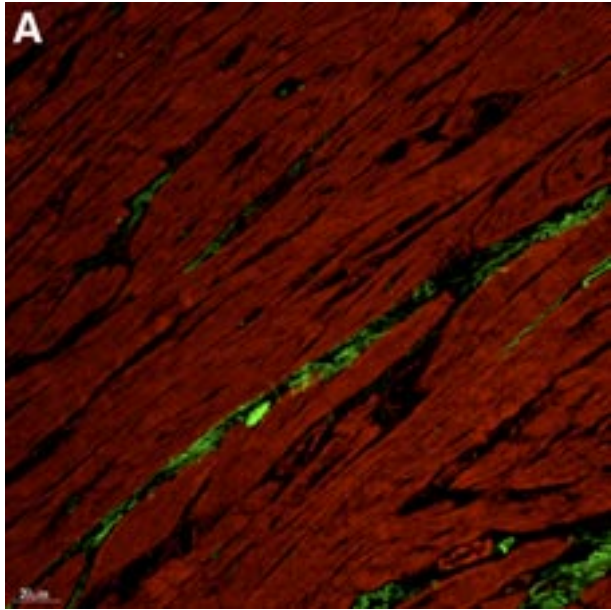


Abb. 9 Auszählungen von **Kollagen I** in den untersuchten Gruppen.





**Abb.10:**

*Immunohistochemische Darstellung von **Kollagen I** im menschlichen Herzmuskel.*

**(A) Kontrollgruppe:**

*Das Kollagen I stellt sich in Kontrollgewebe als zartes Netz zwischen den Myozyten dar. Der Extrazellulärraum ist nicht verbreitet. Insgesamt sieht das Gewebe homogen aus.*

**(B) Hypertrophierte Gruppe:**

*Durch eine Zunahme an Kollagen I kommt es zu einer regionalen **Verbreiterung** des Extrazellulärraumes. Hier bilden die Faserproteine teilweise ein Geflecht mit unterschiedlich großen Zwischenräumen oder sie sind dicht aneinandergelagert.*

**(C) DCM-Gruppe:**

*Hier ist das Kollagen I deutlich vermehrt vorhanden. Das Gewebe stellt sich als ein inhomogene Masse dar. Das Extrazellulärraum ist deutlich verbreitet.*

### **3.3.4. Chondroitinsulfat**

Chondroitinsulfat gehört zur Familie der sulfatierten Glykosaminglykane, die am häufigsten im Körper vorkommen. Sie geben dem Gewebe die feste Konsistenz. In gesundem Myokard kommen sie im Extrazellularraum vor. Bei der Immunfluoreszenz sind sie homogen gefärbt. Die Chondroitinmarkierung war bei unseren untersuchten Gruppen vermehrt und inhomogen.

### **3.4. Adhäsionsmoleküle und Blutzellen**

Es wurden folgende monoklonale Antikörper verwendet: CD31(PECAM), CD54 (ICAM), CD68, CD45, CD3.

Die Schnitte wurden mit diesen Antikörpern markiert und danach die positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem 25-iger Objektiv in 6 verschiedenen Gesichtsfeldern gezählt und auf n/mm<sup>2</sup> umgerechnet.

### 3.4.1. CD31 (PECAM)

Das „Platelet endothelial cell adhesion molecule“, „Plättchen Endothelzell Adhäsions Molekül“ (PECAM) oder CD31 wird auf den Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten gefunden. Durch Markierung der Endothelzellen kann man die Kapillar-Dichte in den Schnitten beurteilen.

Wir haben festgestellt, daß die Zahl der markierten CD31 positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> in der folgenden Reihenfolge in untersuchten Gewebe tendenziell abnahm: Kontrolle, 1-,2-, 3-Gruppe und DCM (Abb. 11).

Das heißt, daß bei hypertrophierten Gewebe die Zahl der markierten Zellen geringer als bei der Kontrollgruppe war.

Hier kann man davon ausgehen, daß die Kapillardichte bei den untersuchten Gruppen durch Fibrose und Hypertrophie zurückgegangen ist. In Gruppe 3 mit schlechterer Ejektionsfraktion war die Kapillardichte am meisten vermindert. Zwischen Gruppe 1 und 2 war kaum ein Unterschied feststellbar.

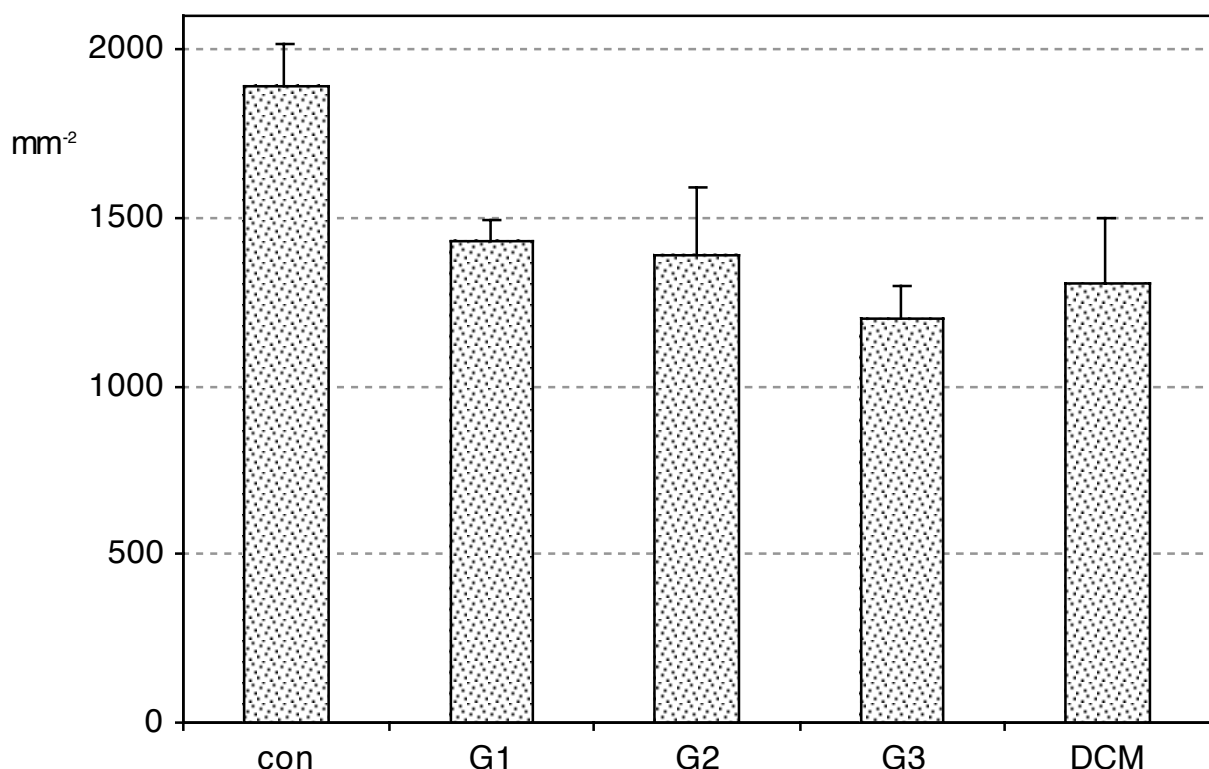
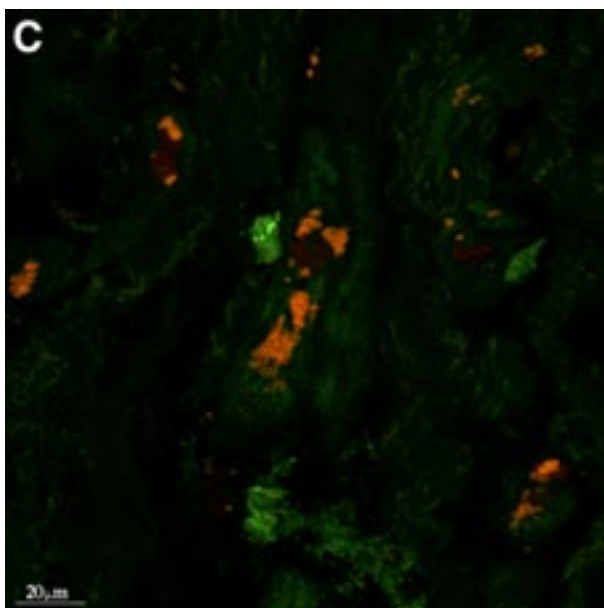
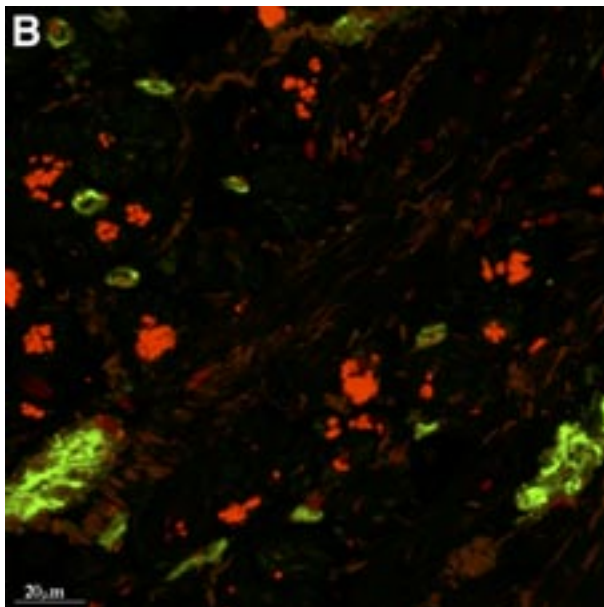
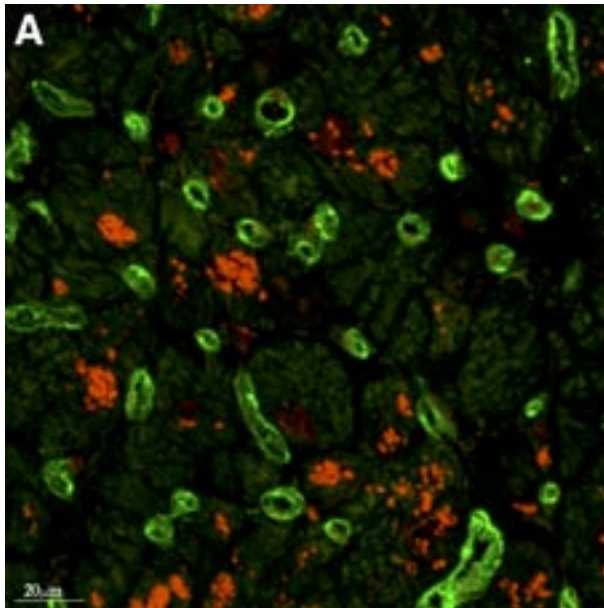


Abb. 11 Durch Markierung der Endothelzellen mit **CD31**-Antikörper wurde hier die Kapillar-Dichte in den Schnitten verglichen. Das Diagramm zeigt eine abfallende Tendenz von Kapillaren besonders in Gruppe 3 und DCM.



**Abb.12:**

*Immunhistochemische Darstellung mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops von **CD 31** in menschlichen Herzmuskel. Hier ist die spezifische Fluoreszenz grün, die Kerne sind rot. Lipofuszin ist orang. CD31-Antikörper markieren die Endothelzellen. Durch Markierung der Endothelzellen kann man die Kapillar-Dichte in den Schnitten beurteilen.*

**(A) Kontrollgruppe:**

*Zahlreiche Kapillaren befinden sich im Kontrollgewebe, die sehr homogen verteilt sind.*

**(B) Hypertrophie Gruppe**

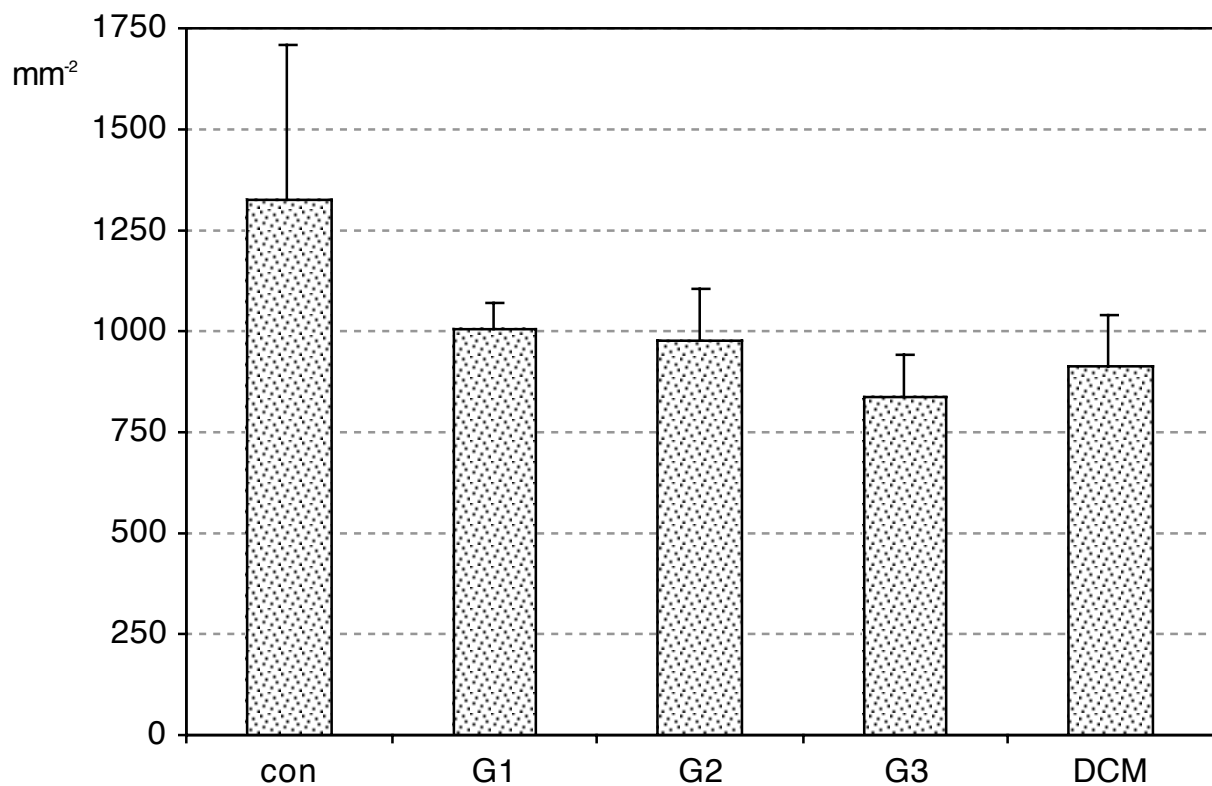
*Der Zahl von Kapillaren sind abgenommen. Das Gewebe sieht inhomogen und gestört aus. Man geht davon aus, daß die Kapillardichte bei den untersuchten Gruppen durch Fibrose und Hypertrophie zurückgegangen ist.*

**(C) DCM-Gruppe**

*In Insuffizienten Herz mit schlechterer Ejektionsfraktion ist die Kapillardichte stark vermindert.*

### 3.4.2 CD54 (ICAM)

CD54 oder Intrazelluläres Adhäsionmolekül 1 (ICAM) ist vor allem auf Monozyten und Granulozyten und weniger auch auf Lymphozyten exprimiert. Ferner zeigt es sich an aktivierten Endothelzellen und markiert so auch die Kapillaren. Unsere Ergebnisse hier entsprechen denen von PECAM (CD31). Die Werte für ICAM waren aber niedriger, weil nicht alle Endothelzellen oder Kapillaren aktiviert sind. In gesundem Myokard finden sich zahlreiche Kapillaren. Die Markierung der Kapillaren in den Untersuchungsgruppen war deutlich vermindert. Zwischen Gruppe 1 und 2 bestehen kaum Unterschiede, bei Gruppe 3 dagegen konnten wir eine Verminderung der Kapillardichte feststellen.



*Abb. 13 Hier wurden die Kapillaren mit Hilfe des **CD54**-Antikörpers markiert. Das Diagramm zeigt eine abfallende Tendenz von Kapillaren besonders in Gruppe 3 und DCM.*

### 3.4.3. CD68

Mit CD68-Antikörper werden Makrophagen markiert. Makrophagen, phagozytieren und verdauen Mikroorganismen und Fremdkörper sowie beschädigte, alte oder tote Zellen. Unsere Zählungen zeigen eine tendenzielle Zunahme der CD68 markierten Zellen in unseren Gruppen. In der Gruppe DCM sind sie nicht nur im Vergleich zur Kontrollgruppe sondern auch im Vergleich mit den anderen drei Gruppen erhöht. Innerhalb der Gruppen waren keine signifikante Unterschiede feststellbar (Abb. 14, 15).

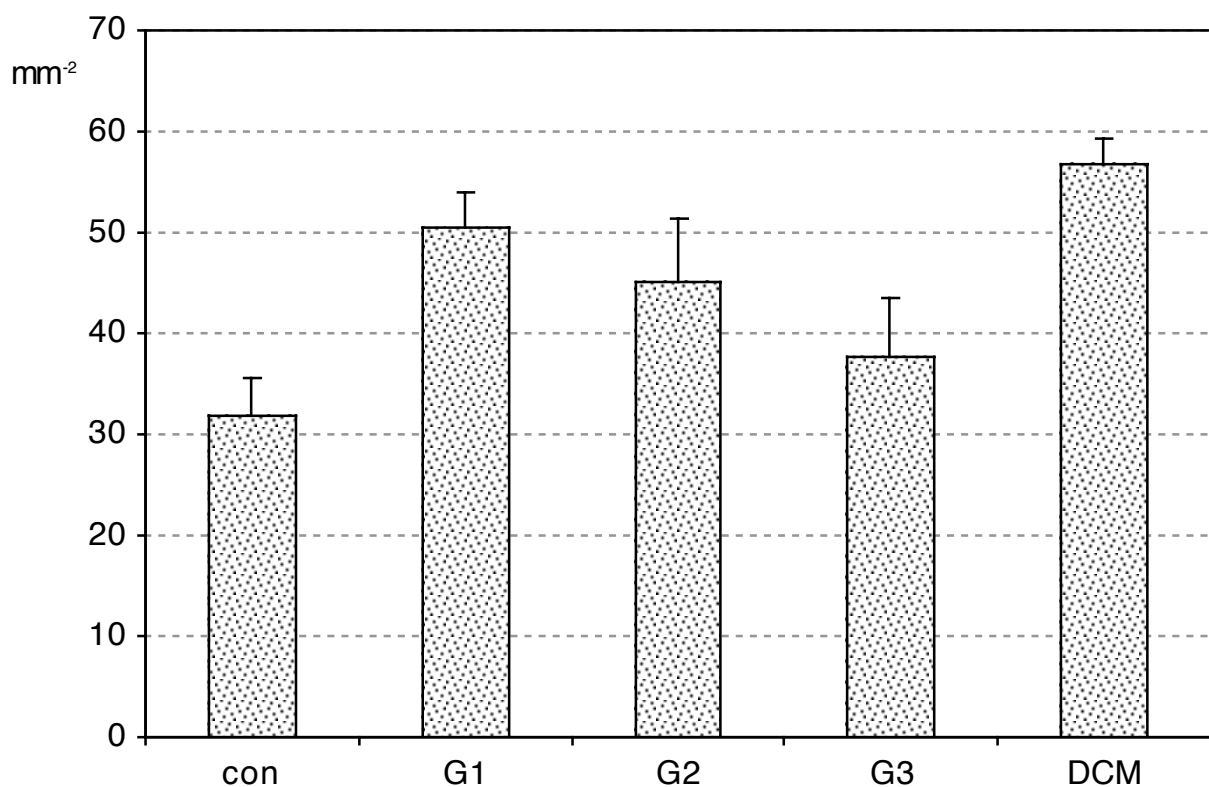
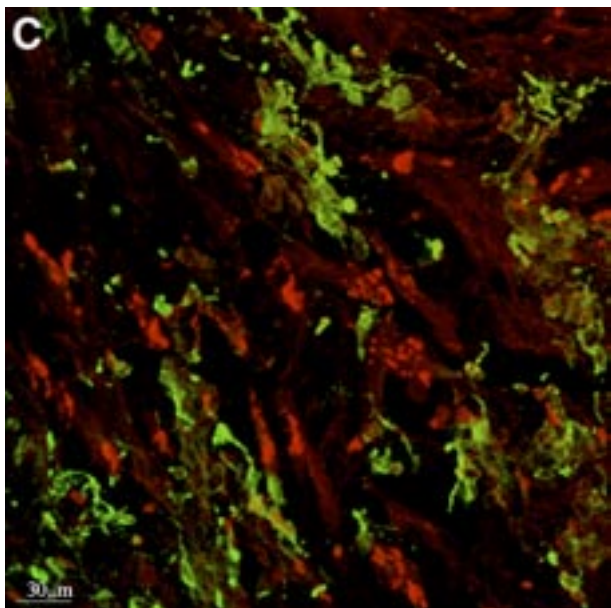
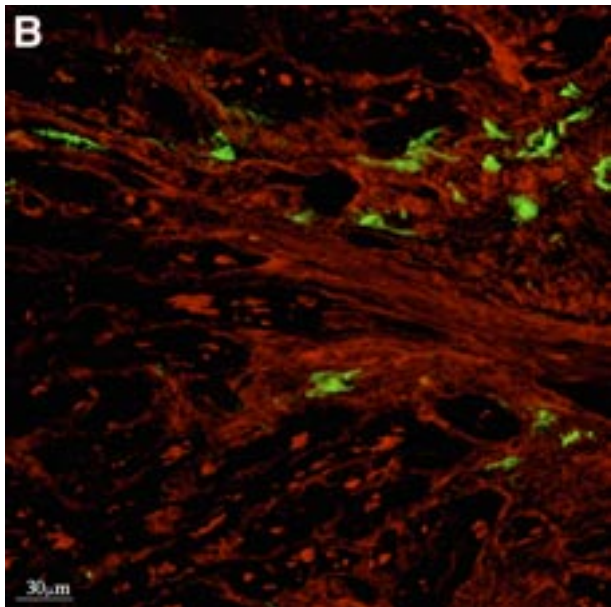
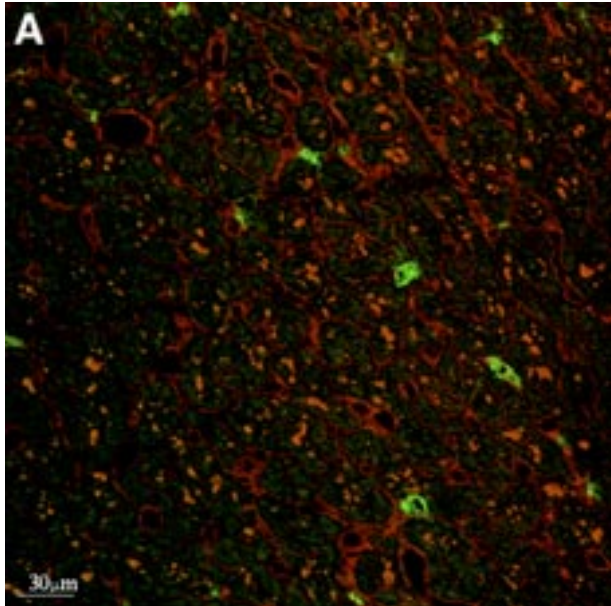


Abb. 14 Das Diagramm zeigt **CD68** markierten Makrophagen in unseren Gruppen.

### 3.4.4. CD45

CD45 wird von Leukozyten exprimiert. Hier wurde die CD45-AK-Markierung als Maß der Entzündung gemessen. In allen Gruppen fanden sich vermehrt positiv markierte Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der Gruppen konnten wir auch eine kontinuierliche Zunahme feststellen. (Abb. 16, 17)





**Abb.15:**

*Markierung der Makrophagen mit **CD68** in Grün. Konfokale Mikroskopie.*

**(A) Kontrollgruppe:**

*Hier fñhlt wenig markierte Makrophagen auf. Das Gewebe ist sehr homogen. Myozyten sind sehr gleichmñßig und fast alle gleich Groñ.*

**(B) Hypertrophierte Gruppe:**

*In vergleich zu Kontrollgruppe findet man hier mehr Makrophagen. Das Herzstruktur ist hier gestört und Myozyten variieren in Groñ.*

**(C) DCM-Gruppe:**

*Zahlreiche Makrophagen befinden sich im Interstitium von insuffizientem Myokard.*

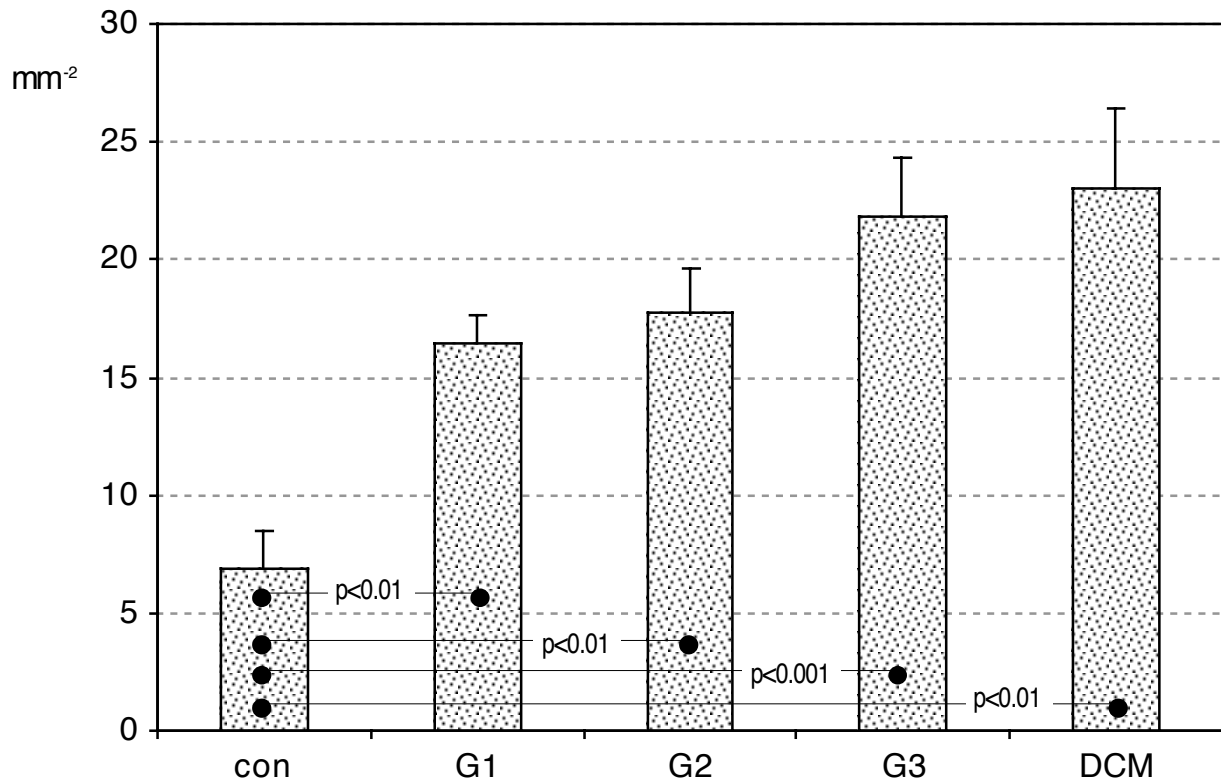


Abb. 16 **CD45**-Antikörper markiert die Leukozyten. Folgendes Diagramm zeigt eine statistisch signifikante Zunahme von **CD45** markierten Zellen in DCM- und Hypertrophie-Gruppen.

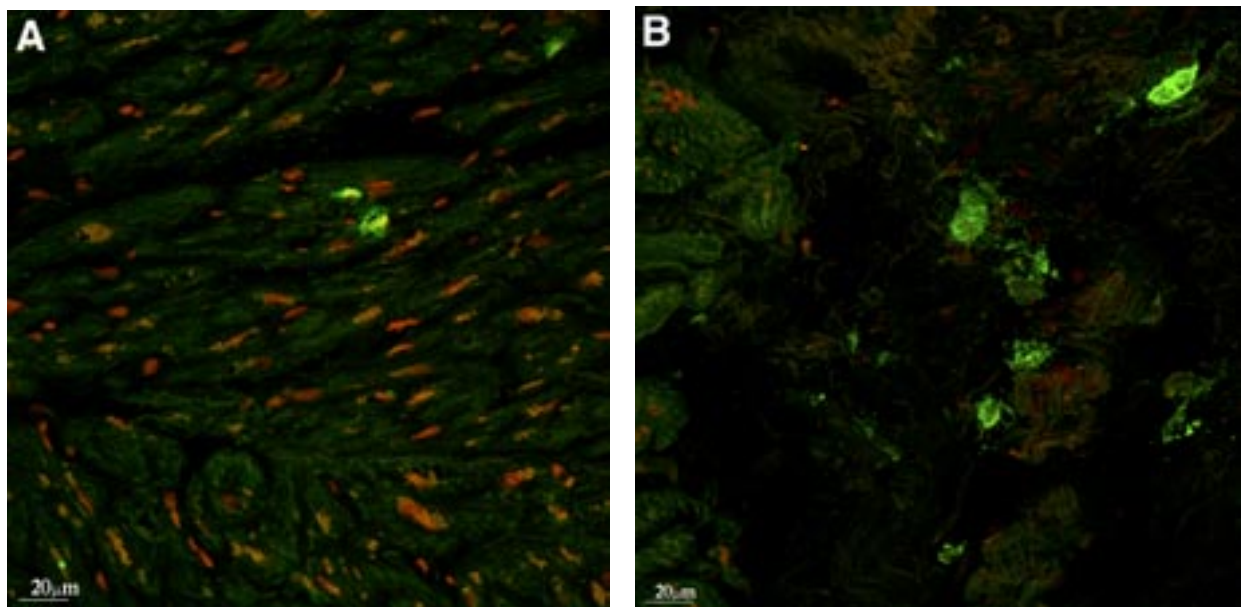


Abb.17: Markierung der Leukozyten mit **CD45**. Leukozyten sind stark in Entzündungsgebieten präsentiert. Hier sind die Markierungen auch in Grün. Im Gegensatz zur **Kontrollgruppe** (Abb. A) befindet sich Zahlreiche markierten Leukozyten in der **hypertrophierten** Geweben (Abb. B)



### 3.4.5. CD3

Der CD3-Antikörper reagiert mit T-Lymphozyten (T3). Die T-Lymphozyten sind Träger der zellvermittelten Immunität. Allgemein kam nur eine geringe Anzahl von T-Zellen im untersuchten Gewebe vor. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die markierten Zellen jedoch in den Gruppen 1 bis 3 sowie in DCM vermehrt. Am häufigsten kamen sie in der DCM-Gruppe vor (Abb.18 und 19)

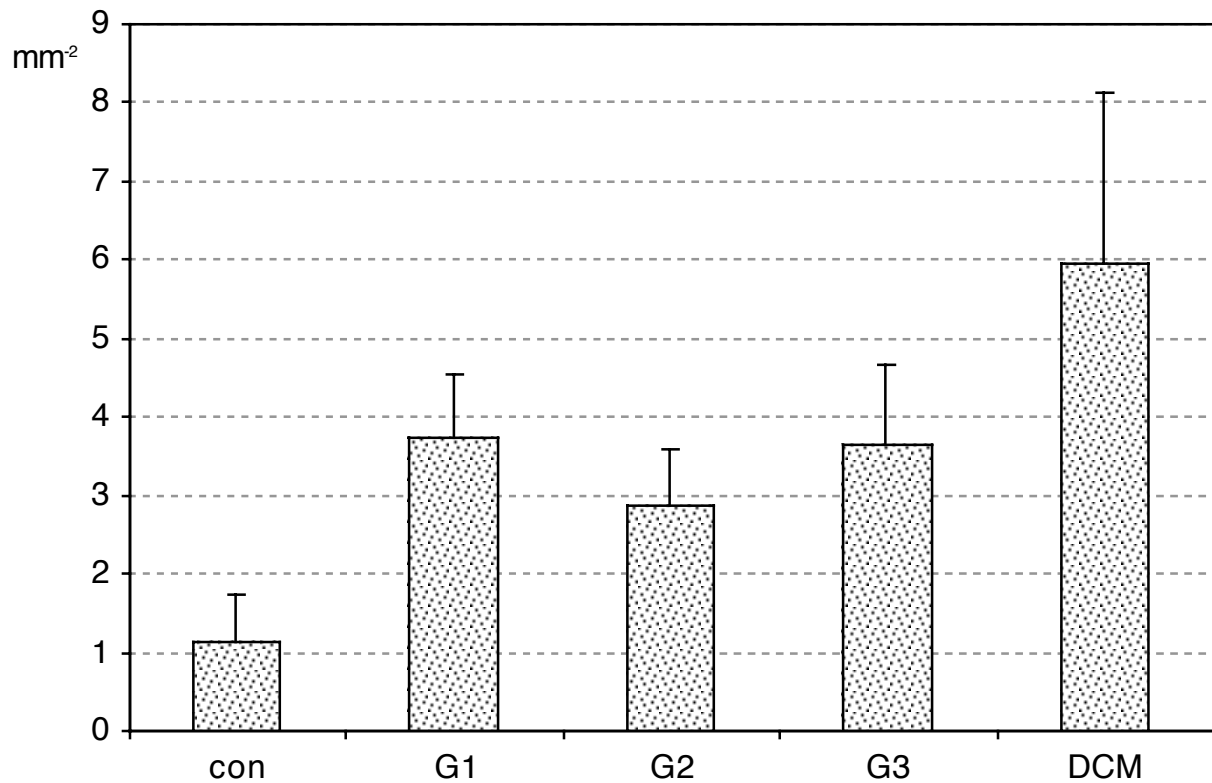
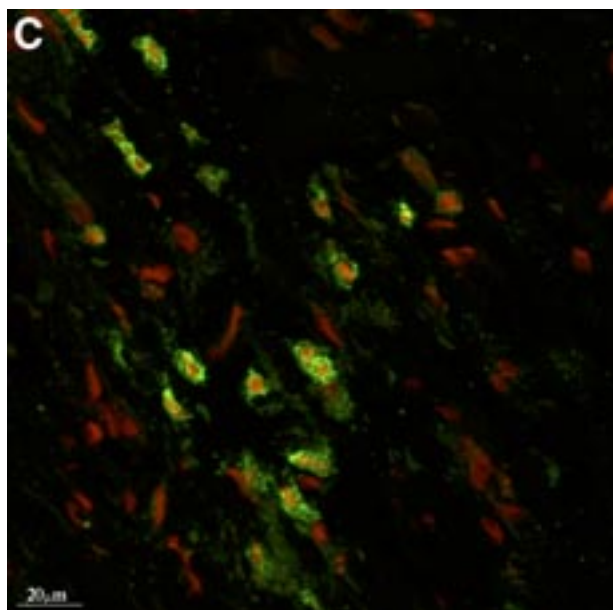
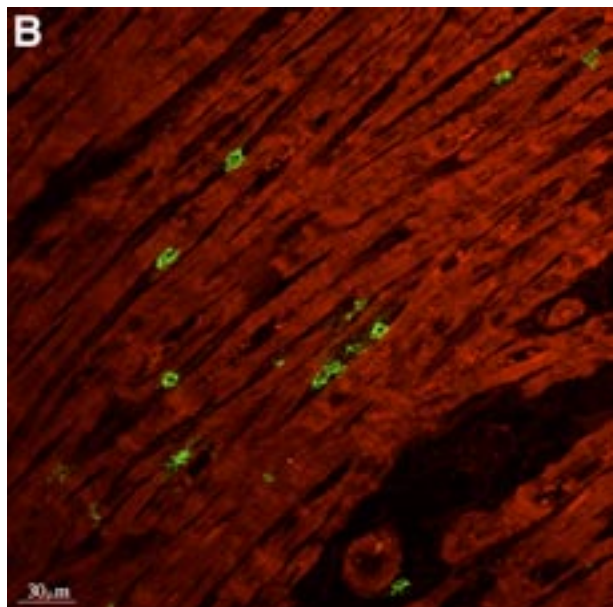
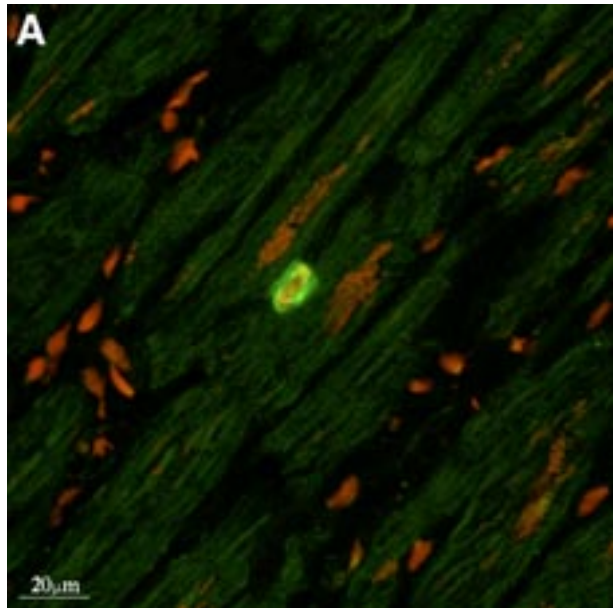


Abb. 18 **CD3**-Antikörper markiert die T-Lymphozyten. Das Diagramm zeigt eine leichte Zunahme von CD3 markierten Zellen.



**Abb. 19:**

*Immunhistochemische Markierung der T-Lymphozyten mit Hilfe von CD3-AK (Grün).*

*(A) **Kontollgruppe** mit sehr gut angeordnete Myozyten und homogene Gewebe. Hier trifft man nur wenig CD3-Markierte Lymphozyten.*

*(B) In **Hypertrophierte** Gruppe findet man mehr als Kontrolle CD3 Markierungen*

*(C) In Gewebe mit dilatativen Kardiomyopathie (**DCM**) befindet sich Zahlreiche CD3 markierten Lymphozyte, die eine Zunahme des Entzündungsprozesses bezeichnet.*

### 3.5. Wachstumsfaktor: Transforming growth factor (TGF- $\beta$ )

Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) gehört zu den Wachstumsfaktoren, die hier mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und Konfokalen Mikroskopie gemessen worden sind. Die TGF- $\beta_1$  positiven Strukturen kamen im Interstitium zwischen den Myozyten vor. An manchen Stellen waren sie als einzelne Markierung, an anderen Stellen als multiple Markierungen zu sehen. Wir haben hier die Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops untersucht.

Auch in der Kontrollgruppe findet man Wachstumsfaktoren, deren gemessene Intensität jedoch im Vergleich zu den Untersuchungsgruppen geringer ausfiel.

Wie man im folgenden Diagramm sehen kann, ist die Fluoreszenzintensität in Gruppe 3 und DCM signifikant erhöht.

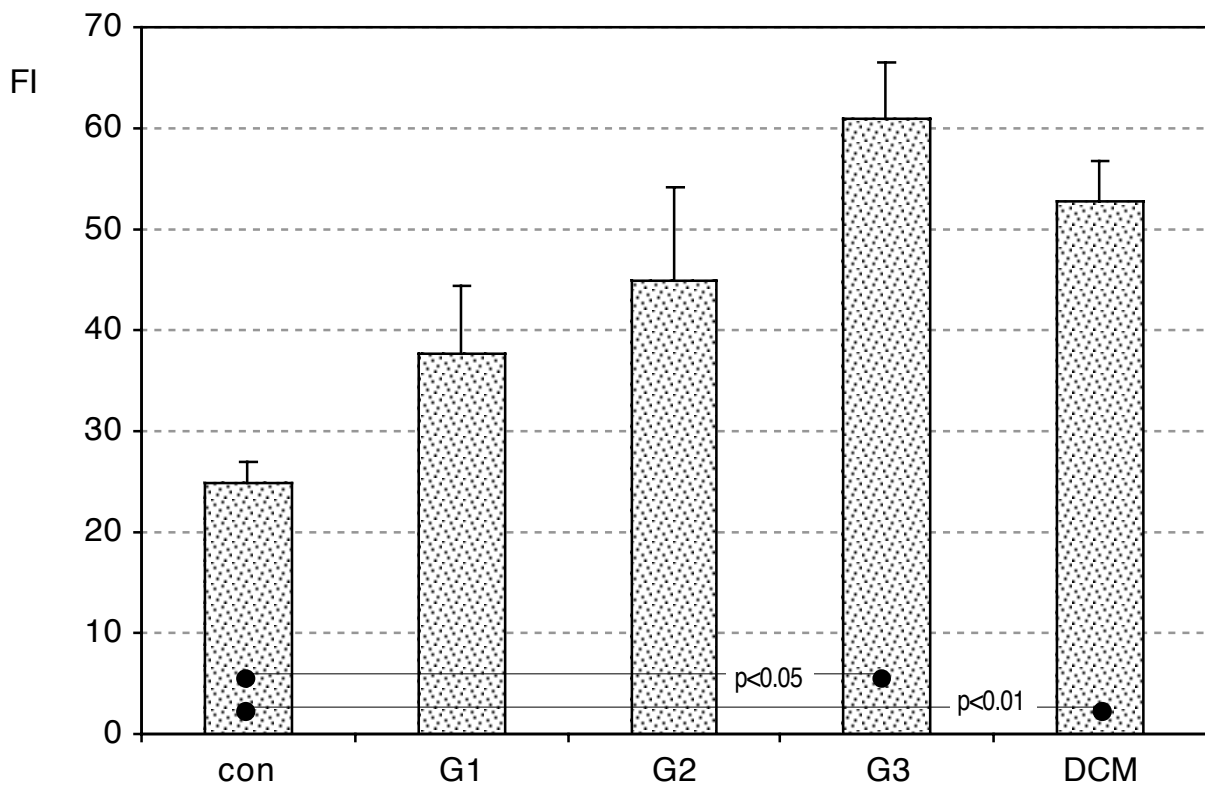
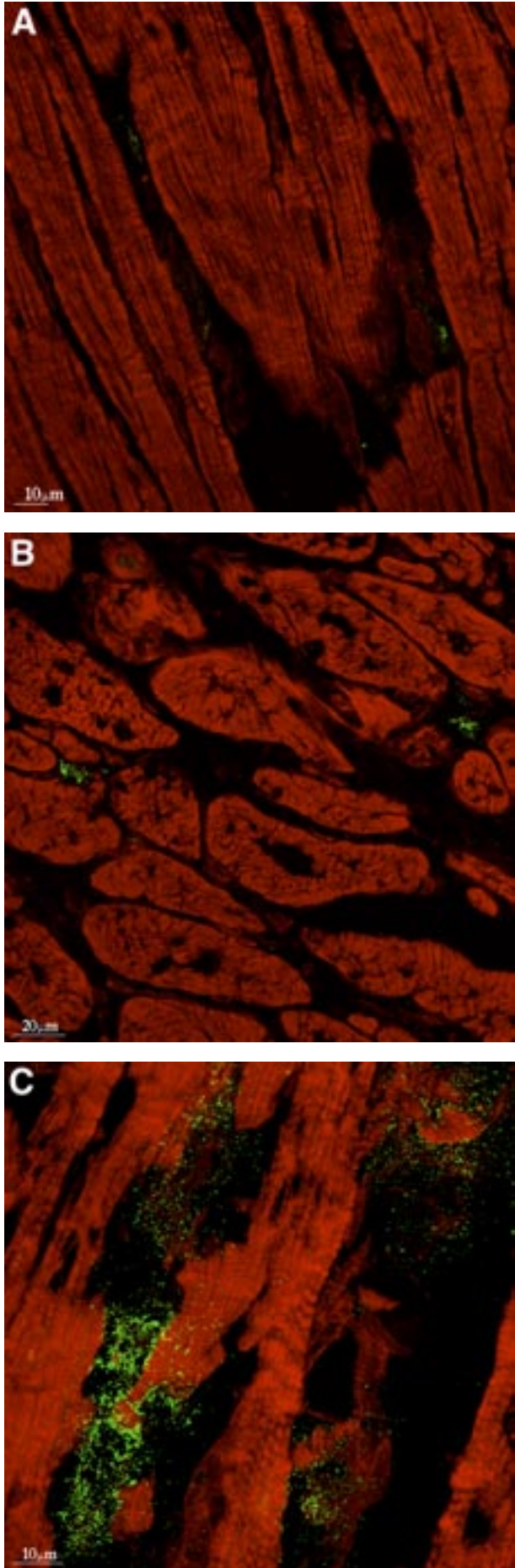


Abb. 20 Das Diagramm zeigt eine signifikante Steigerung der Fluoreszenzintensität (FI) von **TGF- $\beta_1$**  in Gruppe 3 und DCM.



**Abb. 21:**

*Transforming growth factor (**TGF- $\beta_1$** ) sind hier mit Hilfe immunhistochemischer Methoden und Konfokalen Mikroskopie dargestellt. Die positive Zellen sind Grün.*

*Die TGF- $\beta_1$  positiven Strukturen kommen im Interstitium zwischen den Myozyten vor. An manchen Stellen waren sie als einzelne Markierung, an anderen Stellen als multiple Markierungen zu sehen. In **Kontrollgruppe (Abb.A)** findet man im Interstitium einzelne positiv Markierte TGF- $\beta$ . Das Myokard ist sehr homogen.*

*Der Anzahl von TGF- $\beta$ -Markierungen ist im **hypertrophie Gruppe (Abb.B)** gestiegen.*

*Im **DCM-Gruppe (Abb.C)** sind die markierten TGF- $\beta$  deutlich angestiegen und hier sieht man multiple Markierungen im Interstitium der insuffizienten Herz.*

## **4. Diskussion**

### **4.1. Von Hypertrophie bis Herzversagen**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die strukturellen Veränderungen der extrazellulären Matrix, die Entstehung und Ausbreitung der Fibrose, und den Zusammenhang zwischen den markierten Entzündungsparametern mit der Zunahme der Funktionseinschränkung des Herzens und anderen ähnlichen Mechanismen, die wahrscheinlich für den Übergang der kompensierten zur dekompenzierten Herzhypertrophie und Herzversagen verantwortlich sind, zu untersuchen. Dafür hatten wir drei Patientengruppen ausgewählt, die durch jahrelang bestehende Aortenklappenstenose einer ständigen Drucküberlastung des linken Ventrikels ausgesetzt waren. In der Anfangsphase haben diese Patienten als strukturelle Antwort auf die funktionelle Überlastung eine kompensierte Hypertrophie entwickelt, die dann in Dekompensation überging und letztlich in einer Herzinsuffizienz endete. So ist die Herzhypertrophie zunächst als eine Adaptation bei Überlastung anzusehen <sup>5</sup>

Die funktionellen und strukturellen Veränderungen, die für die Herzinsuffizienz charakteristisch sind, wurden in den letzten Jahren sehr gut untersucht und beschrieben wie im folgenden Text genauer beschrieben werden wird. Es ist aber immer noch unklar, wie der Verlauf und die charakteristischen Veränderungen von kompensierter Herzhypertrophie bis zum Herzversagen entstehen.

Definitionsgemäß ist die Herzhypertrophie die Massenzunahme des Myokards als Folge einer vermehrten Muskularbeit entweder durch Druckerhöhung, Volumenvermehrung oder durch Erhöhung des peripheren Widerstands.

Man unterscheidet zwischen konzentrischer und exzentrischer Hypertrophie. Der Unterschied liegt in der Art der Belastung. Wenn eine erhöhte Druckbelastung vorliegt, kommt es als Folge zu einer konzentrischen Hypertrophie; exzentrische Hypertrophie entsteht als Folge einer vermehrten Volumenbelastung.

Makroskopisch erkennt man die Hypertrophie an folgenden Kriterien: Verdickung der Herzkammerwand und dadurch Erhöhung der Wandspannung. Das Myokard ist leicht dunkel gefärbt und hat eine feste Konsequenz. Die Trabekel und Papillarmuskeln sind verdickt.

Im Anfangsstadium der kompensierten Hypertrophie kann es nach Beseitigung der Ursache noch zu einer Normalisierung der Wandspannung kommen.

Dieser Mechanismus ist von grundlegender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der normalen Kammerfunktion. Hier besteht klinisch noch keine Leistungsminderung <sup>19,20</sup>.

Eine dekompensierte Herzinsuffizienz kommt zustande, wenn die hypertrophierte Muskulatur nicht mehr in der Lage ist, die Wandspannung zu normalisieren. Die kontraktile Funktion auf der Ebene der Muskelfaser und der Myozyten ist nicht ausreichend, um die normale Pumpfunktion aufrecht zu erhalten. Myokardiale Schäden, die durch Fibrose in der Wand ersetzt worden sind, sind in der Anfangsphase minimal. Daneben treten am Anfang geringe Zellverluste auf <sup>21</sup>. Wenn die Belastungen bestehen bleiben oder sogar fortschreiten, kann das Herz diese irgendwann nicht mehr kompensieren. Es kommt zur Herzinsuffizienz.

Die myokardiale Kontraktilität nimmt zuerst mit der Hypertrophie zu, fällt dann jedoch bis zum Herzversagen kontinuierlich ab <sup>22</sup>.

Schaub et al. konnten mit Hilfe eines Kardiomyozyten-Modells in Kultur eine Anzahl von Faktoren wie Katecholamine, vasoaktive Peptide, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone identifizieren, die als hypertrophische Stimulantien auf die Kardiomyozyten wirken <sup>23</sup>.

Bei Patienten mit Aortenklappenstenose lösen der erhöhte Druck und dadurch die zugenommene Herzwandbelastung ein Signal für die linksventrikuläre Hypertrophie aus. Auf den ersten Blick scheint es, daß diese Hypertrophie ein günstiger Faktor zur Erzeugung einer normalen EF bei Aortenklappenstenose ist, aber die Daten von 23 Studien zeigen, daß ein umgekehrtes Verhältnis zwischen EF und angiographisch gemessener Wanddicke herrscht, zitiert in <sup>24</sup>.

Wenn das Herz wiederholt oder dauerhaft unter zu hoher Belastung steht, treten auch strukturelle Veränderungen oder „Remodeling“ auf. So kommt es zum Beispiel zu einer Myozyten-Vergrößerung durch Hypertrophie. Herzhypertrophie ist ein wesentlicher Risikofaktor für Herzerkrankungen wie Herzinfarkt und Herzarrhythmien <sup>25</sup>.

Hypertrophie wird von einem signifikanten Anstieg der Zellmasse, d.h. von einem Proteinanstieg, der eine Zunahme der myofibrillären Strukturen verursacht, begleitet <sup>26</sup>. Wir konnten auch bei unsere Gruppen die Myozytenvergrößerung messen und so die oben erwähnte Hypothese bestätigen. Wir konnten zeigen, daß mit Abnahme der Herzfunktion die Zellgrößen zunahmen. Die EF-Abhängigkeit war also auch hier vorhanden. Interessant war zu beobachten, daß in der Gruppe 1, wo trotz erhöhter Fibrose noch eine normale EF herrschte die Myozytengröße der des gesunder Gewebes entsprach.

Zunahme des Herzdrucks infolge konzentrischer Hypertrophie bewirkt eine Zunahme der Wanddicke ohne Kammerhöhlen-Vergrößerung<sup>19,20,27</sup>. In ihrer kompensierten Form wird die Wanddicke aufgrund der Erhöhung des Myozytendiameters vergrößert, dabei bleibt die Zahl der Myozyten und auch die Gesamtzahl der Zellen in dem Ventrikel unverändert<sup>27</sup>.

Die Kombination dieser Ereignisse führt zu einer Zunahme des Verhältnisses zwischen ventrikulärer Masse und ventrikulärem Volumen. Diese anatomische Charakteristik kommt bei Patienten mit Aortenstenose oder chronischer systemischer Hypertension ohne klinische ventrikuläre Dysfunktion vor<sup>19,21,28</sup>.

Zahlreiche ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen an Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie und terminaler Herzinsuffizienz zeigten Veränderungen der Anordnung des kontraktilen Materials. Studien von Hein et al. zeigten, daß in Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz sowohl die sarkomeren Strukturen als auch die Menge und die Organisation der kontraktilen Proteine gestört sind<sup>29</sup>.

Auch die Untersuchungen von Schaper et al. ergaben mehrere morphologische Veränderungen in Herzgewebe von Patienten, die unter dilatativer Kardiomyopathie litten, wie z.B. degenerative Veränderungen der Myocyten, Fehlen des kontraktilen Materials, desorganisiertes Zytoskelett und Sequestrierung von zellulären Partikeln in den extrazellulären Raum. Dazu kam die Vergrößerung des Extrazellularraums aufgrund der Fibrose und das Auftreten zahlreicher Makrophagen und Fibroblasten<sup>30</sup>.

Auf der Basis dieser Befunde geht man von einer Wechselwirkung zwischen den Myozyten und dem Extrazellularraum aus.

Aus den Daten der Literatur kann die wesentliche Bedeutung der strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix bei der Entwicklung der terminalen Herzinsuffizienz abgeleitet werden. In unseren Untersuchungen haben wir versucht, die Bedeutung der Veränderungen beim Übergang von kompensierter Herzhypertrophie zu Dekompensation und Herzinsuffizienz festzustellen. Bei Gruppe 1 handelte es sich um kompensierter Herzhypertrophie, in Gruppe 2 und 3 geht diese Kompensation zur Dekompensation über. Bei der DCM-Gruppe handelte es sich um Herzinsuffizienz.

## **4.2. Zytoskelett**

Das Zytoskelett besteht aus drei Fasersystemen: die intermediären Filamente, die Mikrotubuli und die Mikrofilamente. Letztere sind dünne Filamente mit einem



durchschnittlichen Durchmesser von 6 nm. Mikrotubuli sind röhrenförmige Gebilde mit einem äußeren Durchmesser von 24 nm und mit einer variablen Länge. Intermediärfilamente besitzen einen Durchmesser von 7-11 nm; sie bestehen aus immunologisch miteinander verwandten Proteinen. Sie erhielten ihren Namen, da sie dünner als die „dicken“ Mikrotubuli, aber dicker als die „dünnen“ Aktinfilamente sind. Zur Identifizierung unbekannter neoplastischer Zellen können Antikörper gegen Intermediärfilamente verwendet werden, da diese Zellen oft Filamente ihrer Ursprungsgewebe aufweisen. Dies findet vor allem Anwendung in der Diagnostik von Tumoren des Weichteilgewebes. Die Filamente können aus verschiedenen Proteinen (Heteropolymere) oder aus einem einzigen Protein (Homopolymere) zusammengesetzt sein. Desmin bildet in der Mehrzahl der Fälle Homopolymere.<sup>31</sup>

Die Intermediärfilamente weisen ein gemeinsames Grundmuster auf. Sie bestehen aus Polypeptiden unterschiedlicher Aminosäuresequenz und haben ein bemerkenswertes Größenspektrum. Sie setzen sich aus einem amino-terminalen Kopf, einem -helikalen Zentrum und einem carboxy-terminalen Ende zusammen.

Der mittlere Teil setzt sich aus 310-315 Aminosäuren zusammen und besteht aus Wiederholungen von einer Sequenz aus sieben Aminosäuren, die sogenannten „heptad repeats“. Durch paralleles oder antiparalleles Aneinanderlagern bilden die Proteine zunächst Dimere, die sich dann zu Tetrameren zusammenfinden. Diese bilden die Untereinheiten, aus denen die Filamente zusammengesetzt sind. Deshalb verfügen sie trotz ihrer großen Vielfalt über einen ähnlichen Aufbau<sup>32</sup>.

Die Funktion der Intermediärfilamente ist nicht sicher aufgeklärt. Man geht davon aus, daß sie die Zellarchitektur stabilisieren. Besonders Desmin soll in den kontraktilen Zellen diese Funktion übernehmen und die Zellorganellen während der Kontraktion schützen.

#### **4.2.1. Desmin**

Desmin hat ein Molekulargewicht von 55.000 Dalton und wird zu den zytoskelettären Proteinen gezählt, die sowohl in quergestreiften, als auch in glatten Muskelzellen exprimiert werden<sup>33</sup>.

In Zellen der quergestreiften Muskulatur ist Desmin im Z-Streifen lokalisiert. In der Herzmuskulatur ist es außerdem im Glanzstreifen zu finden<sup>34</sup>.

Desmin gehört zur Familie der "Intermediär-Filamente"<sup>35</sup>. Diese gehören zu den stabilen Komponenten des Zytoskeletts und den am wenigsten löslichen



Zellbestandteilen. Sie bilden um den Zellkern, mit dem sie verknüpft sind, ein Netzwerk und erstrecken sich von hier aus durch das Zytoplasma in die Zellperipherie. Dabei treten sie an Desmosomen heran, so daß über die Zellen hinweg ein Gerüstwerk von interzytoplasmatischen Filamenten entsteht <sup>36</sup>.

Desmin ist einer der frühesten Marker für Muskelgewebe in Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen. Es wurde früher angenommen, daß Desmin lediglich ein Skelettprotein ist, das die Zellarchitektur stabilisiert. Es scheint jedoch, daß Desmin eine Schlüsselrolle in der Myogenese hat; d.h. Myogenese wird durch Anwesenheit von Desmin ermöglicht <sup>37</sup>. Desmin wird sowohl in embryonalen Zellen als auch in reifen glatten Muskelzellen exprimiert <sup>38-40</sup>, und es kommt bei gesunden Myozyten in niedrigen Mengen vor.

Man hat festgestellt, daß sich die Expressionsrate von Desmin zu Beginn einer Differenzierungsphase des Myozyten um ein Vielfaches erhöht <sup>41</sup>.

Goldman und Geiger haben unabhängig von einander gezeigt, daß die Funktion des Desmins in der Vermittlung von Signalen zwischen der Zellmembran und dem Nukleus, und in der Stabilisierung der Muskelzellen besteht <sup>42,43</sup>. Auch die Untersuchungen von Stromer et al. gaben Hinweise über die Interaktionen zwischen Desmin-Filamenten mit den Zellkernen, vielleicht auch mit Mitochondrien in den glatten Muskelzellen <sup>44</sup>.

In unseren Experimenten konnten wir in der ersten Gruppe (Aortenklappenstenose) keine signifikanten Unterschiede bei der Desminmenge feststellen. Die Gleichmäßigkeit und Ordnung des Desmins war jedoch in vielen Myozyten aufgehoben. Wir nehmen an, daß diese Ungleichmäßigkeit, die aufgrund dauerhafter Überlastung des Herzens zustande kam, zu Störungen im Muskelaufbau führt. Daß Desmin für die Aufrechterhaltung der Muskelfaserarchitektur wichtig ist, konnten auch die Untersuchungen von Capetanaki et al. & Milner et al. Zeigen <sup>33,36</sup>.

Capetanaki et al. zeigten, daß Desmin absolut notwendig für die Muskeldifferenzierung in vitro ist, und eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Funktion der Myofibrillen und der gesamten Funktion des Muskels spielt. Daten, die diesbezüglich bei Knockout-Mäusen und bei „Desmin-Null-Mäusen“ gesammelt wurden, demonstrieren diese wichtige Funktion von Desmin. Desmin-Null-Mäuse zeigen schwere Störungen im Muskelaufbau und der Muskelfaserarchitektur <sup>36</sup>.

Das Fehlen von diesem Protein führt zu einer erheblichen Störung in der Zellarchitektur. Dies betrifft neben den glatten Muskelfasern auch die

Kardiomyozyten und die quergestreiften Muskelfasern. Bei den glatten Muskelfasern kommt es zu einer Hypoplasie und Degeneration der einzelnen Myozyten <sup>45</sup>.

Auch die Untersuchungen von Darnell et al. und Weitzer et al. zeigten, daß Desmin-Filamente alle benachbarten Z-Scheiben miteinander verbinden und orientieren können, so daß alle Myofibrillen in einer Muskelzelle zueinander ausgerichtet und geordnet erscheinen <sup>46</sup>. Weitzer et al. Konnten bei Mäuseembryos zeigen, daß die Abwesenheit von Desmin die Myogenese von glatten Muskelzellen komplett inhibitiert <sup>47</sup>. Die Schlussfolgerung dieser Studien ist, daß Desmin in kontraktilen Zellen eine stabilisierende Rolle spielt und während der Kontraktion die Zellorganellen schützt, bei seinem Fehlen, also die stabilisierende Rolle und der Schutz fehlt und es zur Einschränkung der Kontraktion im Ventrikel kommt. Die Reduzierung der Myozytenstabilität führt dazu, daß die Myokardzellen vermehrt Zytoskelettmaterial wie Desmin exprimieren, um die Stabilität der Zellen aufrecht zu erhalten. Allerdings ist trotz der Neusynthese dieses Proteins das Kontraktionsvermögen des Myokards herabgesetzt.

Bei unseren Untersuchungen war die Expressionszunahme von Desmin in der DCM-Gruppe besonders ausgeprägt, und die Anordnung und Gleichmäßigkeit des Desmins war hier stark gestört. Aus diesen Veränderungen ist zu schließen, daß die Myozyten bei dilatativer Kardiomyopathie signifikant weniger funktionelle Strukturen besitzen. Gleichzeitig sind die Zellen auch von geringerer struktureller Stabilität, da ihr Zytoskelett degenerativ verändert ist.

### **4.3. Extrazelluläre Matrix**

Gewebe bestehen nicht nur aus Zellen, sondern einen erheblichen Teil ihres Volumens nimmt der extrazelluläre Raum, das Interstitium, ein. Das Interstitium besteht aus einem komplexen Makromolekülgeflecht, der extrazellulären Matrix, in die zelluläre Elemente wie Fibroblasten, Makrophagen und Gefäße eingebettet sind. Die Matrix besteht aus verschiedenen Polysacchariden und Proteinen, die in enger Verbindung mit den Zellen um einem strukturierten Maschenwerk liegen <sup>48</sup>.

Die extrazelluläre Matrix beeinflusst die Entwicklung, Bewegung, Vermehrung, die Form und die Stoffwechselfunktion der Zellen. Die extrazelluläre Matrix beeinflusst auch die mechanische Stabilität eines Gewebes und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Zellen und bei der zellulären Differenzierung, Proliferation und Migration. In der Matrix kommen folgende Hauptklassen vor:

- 1) Glykosaminglykane, die in vier Gruppen eingeteilt werden: 1. Hyaluronan  
2. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat 3. Heparansulfat und Heparin, und  
4. Keratansulfat.
- 2) Faserproteine, die man anhand ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen kann:  
Strukturproteine (z.B. Kollagen und Elastin) und Anheftungsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin) <sup>49,50</sup>. Von diesen wurde in dieser Arbeit Fibronectin, Kollagen, Laminin und Chondroitinsulfat untersucht.
- 3) Integrine

Die Verbindungen zwischen intrazellulären Strukturen und der extrazellulären Matrix werden durch Integrine hergestellt. Diese transmembranären Rezeptoren stehen intrazellulär mit Bestandteilen des Zytoskeletts (Aktin, Vinculin, Talin) in Kontakt und binden gleichzeitig an Fibronectin, Laminin und Kollagen in der Matrix an. Die Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten, eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Untereinheit. Die unterschiedliche Kombination dieser Untereinheiten ermöglicht eine große Vielfalt der Integrine <sup>51</sup>.

Manche Integrine wie  $\alpha_5\beta_3$  sind in der Lage, unspezifisch verschiedene Matrixproteine zu binden, im Gegensatz zu spezifischen Integrinen, die nur für ein einziges extrazelluläres Matrixprotein bestimmt sind. Zum Beispiel für Fibronectin gibt es mehrere Integrine ( $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ) <sup>52</sup>.

Durch die Fähigkeit, zwischen Zellinnerem und dem umgebenden Milieu Kontakt herzustellen, sind die Integrine wichtige Strukturen für Zellerhaltung und Zellstabilität. Dabei scheint es, daß verschiedene Integrine auch unterschiedliche Funktionen haben; so fördern z.B.  $\alpha_1$  Integrine die Adhäsion von glatten Muskelzellen an Fibronectin (Matrixprotein) und Laminin (Bestandteil der Basalmembran), und  $\alpha_3$ -Integrine spielen bei der Migration der glatten Muskelzellen eine Rolle <sup>53</sup>. Neben den Integrinen sind auch Interaktionen zwischen verschiedenen Matrix-Proteinen untereinander bekannt, wie zum Beispiel Kollagen VI, das Bindungsstellen für Kollagen I besitzt. Eine weitere Fähigkeit der extrazellulären Proteine ist die Speicherung von Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast-Growth-Factor (bFGF), oder Transforming-Growth-Factor  $\beta$  (TGF- $\beta_1$ ) <sup>54</sup>.

Die Ansammlung von übermäßiger Matrix und von Bindegewebszellen resultiert der Fibrose. Bei der Entwicklung des Herzversagens nach einem Myokardinfarkt oder bei chronischer Hypertonie sowie vaskulärer Hypertrophie und Restenose spielt die Entstehung einer Fibrose im kardiovaskulären System eine wichtige funktionelle Rolle <sup>55</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollte die Entwicklung einer Fibrose bei der Druckhypertrophie untersucht werden. Die Befunde werden im folgenden Text diskutiert.

### **4.3.1. Fibronektin**

#### *Molekulare Struktur*

Fibronektin ist ein Glykoprotein, das als Dimer vorliegt und eine hohe Molekülmasse besitzt. Sein Molekulargewicht beträgt 440 kDa. Das Molekül besteht aus drei verschiedenen Sequenzhomologien, die als Typ I, II und III bezeichnet werden <sup>56</sup>. Die beiden Fibronektin-Ketten sind am carboxylterminalen Ende durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Außerdem weist Fibronektin die für Adhäsionsproteine typische RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) auf.

Fibronektin besteht aus etwa 2500 Aminosäuren <sup>56</sup>, von denen durch alternatives Splicing mehrere Isoformen oder Domänen existieren.

Alle Formen des Fibronektins sind in einem einzigen Gen kodiert, das etwa 50 Kilobasen lang ist und ungefähr 50 Exons von ähnlicher Größe umfasst.

Es gibt mehrere Formen (Isoformen) des Fibronektins, darunter das lösliche Plasma -Fibronektin, das in Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorkommt und vermutlich bei der Blutgerinnung, Wundheilung und Phagozytose mitwirkt. Alle anderen Formen binden sich an die Oberfläche von Zellen und werden in der ECM als unlösliche Form abgelagert.

#### *Lokalisation im Gewebe*

Fibronektin ist ubiquitär in der Matrix vorhanden, in die strukturelle Proteine wie das Kollagen und zelluläre Bestandteile eingebettet sind <sup>57</sup>.

Hierbei handelt es sich um ein hochmolekulares Protein, das von fast allen Zellen außer Myozyten und neuronalen Zellen gebildet werden kann. Fibronektin findet sich im perizellulären Bereich von Fibroblasten und anderen adhären Zellen, aber auch homogen im Bindegewebe in Form dünner Fibrillen.

Fibronektin kommt in der Basallamina und im Bindegewebe in vivo und auf der Oberfläche gezüchteter Zellen vor. Es besitzt spezifische Bindungsdomänen für Kollagen, Heparin, Fibrin und Staphylokokken <sup>58</sup>.

Das Protein kommt in der ECM von Muskeln, lymphatischem Gewebe, Drüsen der Haut, des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitaltraktes, aber auch in Körperflüssigkeiten vor <sup>59</sup>.

### *Funktionelle Eigenschaften*

Fibronektin fördert den Kontakt von Fibroblasten und anderen Zellen zur Matrix, und Laminin sorgt für die Anheftung der Epithelzellen an die Basalschicht <sup>48-50</sup>. Diese Moleküle ermöglichen die Interaktion einer Vielzahl von Zellen durch Integrin- und Non-Integrin-Rezeptoren <sup>60</sup>.

Miyamoto et al. haben die Rolle von Fibronektin und dessen Integrinen untersucht und zeigten, daß sie eine entscheidende Rolle bei einer Reihe von morphologischen Prozessen, in denen sie eine Zell-Zell-Adhäsion, Migration und Signaltransduktion vermitteln, spielen. Sie wirkt bei der transmembranären Organisation von Zytoskelett- und Signalmolekülen in multimolekularen Komplexen von mehr als 30 Proteinen mit Integrinen mit. Fibronektin und Integrine sind Auslöser einer Reihe von Signalen zur Übermittlung der Regulationsprozesse, die für normale Morphogenesis, und spezifische Genexpression verantwortlich sind <sup>61</sup>.

Fibronektin besitzt einerseits Affinität zu Zelloberflächen, andererseits zu Matrixsubstanzen, z.B. Kollagen; dadurch verhaften diese Strukturen miteinander. Außerdem wird vermutet, daß Fibronektin zur Akkumulation von Vorstufen des Kollagen an der Oberfläche von Fibroblasten beiträgt und so auf die Bildung der intrazellulären Substanzen Einfluss nimmt.

Die Bedeutung von Fibronektin für das Zellwachstum wurde von Orly und Sato beschrieben. Bei Untersuchungen, die an Follikularzellen bei Ratten gemacht worden sind, waren ohne Fibronektin viele zweikernige Zellen zu sehen. Nach Fibronektinzugabe wurde das Zellwachstum und Mitose gefördert, d.h. die Anzahl an zweikernigen Zellen wurde verringert <sup>62</sup>.

Auch in granulierendem Gewebe und bei verschiedenen pathologischen Gewebsveränderungen, wie zum Beispiel Gewebsfibrose (Leberzirrhose) <sup>63</sup>, dilatativer Kardiomyopathie <sup>64</sup> oder auch Fibromatosen wird Fibronektin verstärkt exprimiert <sup>65</sup>.

Dazu unterstützt Fibronektin die Zellproliferation und -migration <sup>66</sup>. Die Untersuchungen von Thyberg et al. zeigen, daß die Umwandlung von Zellen vom kontraktilen Typ zum synthetisierenden Phänotyp, die eine Vorbedingung der Proliferation ist, nur in Anwesenheit von Fibronektin möglich ist <sup>67</sup>. Die Experimente von Castellani et al. zeigen, daß das Wachstum und die Migration von Endothelzellen nur bei reichlicher Menge von fibronektinreicher ECM stattfindet <sup>68</sup>.

So ist dieses Protein nicht nur für die Anheftung an die Matrix wichtig, sondern dirigiert auch die Wanderung der Zellen <sup>56,69</sup>. Für die Zellreparatur ist die

Anwesenheit von Fibronektin wichtig, denn es hat eine hohe Affinität zu Fibrin<sup>70,71</sup>. Postlethwaite et al. konnten in vitro die chemotaktische Wirkung des Fibronektins auf Fibroblasten zeigen<sup>72</sup>. Fibroblasten migrieren in hyaluronsäurereiche Wundgebiete<sup>73</sup>. Die Untersuchungen von Repesh et al. konnten nachweisen, daß in Granulationsgewebe der Wunden und auch in den Entzündungsgeweben Fibronektin, das von Fibroblasten und Makrophagen produziert wird, diffus vorkommt. Die hier migrierenden Zellen folgten einem Weg, der durch Fibronektin und Fibrinfilamente vordefiniert worden war<sup>74</sup>.

Es gibt sogar Hinweise darauf, daß die Regeneration von peripheren Nerven von Fibronektinexpression begleitet wird<sup>75</sup>.

Fibronektin ist also ein wichtiger Faktor bei Prozessen wie Wachstum, Adhäsion und Differenzierung. Es hat außerdem eine große Bedeutung für die Embryogenese, die Angiogenese und für die Wundheilung. Zusätzlich spielt es eine Rolle in der Hämostase, und es scheint auch das metastatische Potential von Tumorzellen zu beeinflussen<sup>74,76,77</sup>. Es wird daher generell postuliert, daß Fibronektin eine wichtige Rolle innerhalb der Zellmorphologie und der Organisation der ECM spielt<sup>58,78</sup>.

#### *Rolle von Fibronektin bei kardialen Erkrankungen*

Krayenbuehl et al. untersuchten die myokardialen Strukturen von im linken Ventrikel gewonnenen Biopsien und zeigten, daß es keinen Unterschied in dem Durchmesser der Myozyten, interstitieller Fibrose und Volumenfraktion der Myofibrillen zwischen Patienten mit Aortenstenose und einer normalen EF, und Patienten mit erniedrigter EF gibt<sup>24</sup>.

Diese Ergebnisse unterschieden sich von den Ergebnissen von Schwarz<sup>79</sup>, die feststellten, daß die Volumenfraktion der Myofibrillen signifikant bei Patienten mit Aortenklappenstenose in Abhängigkeit von der Höhe der EF signifikant abfällt. Diese Ergebnisse entsprechen auch den hier vorgelegten, denn in dem hier untersuchten Material fanden wir gleichfalls eine EF-abhängige Degeneration. Weiterhin war der Fibrosegehalt um so stärker erhöht, je niedriger die EF war. Wir stellen fest, daß die Fibrose zwischen Gruppe 1 und 2 fast gleich blieb und so die Ergebnisse von Krayenbuehl bestätigt wurden; aber bei zunehmender Einschränkung der Ejektionsfraktion ( hier <30%) nimmt die Fibrose zu. Die immunhistochemischen Untersuchungen von Nogami et al. bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie zeigten, daß die extrazellulären Matrixkomponenten Fibronektin, Laminin, und Kollagen Typ I, III, und IV in den fibrotischen Läsionen, die als Ersatz für zugrundegehende Myozyten gebildet

werden, inhomogen verteilt sind <sup>80</sup>; Wir können diese Ergebnisse in Bezug auf Fibronectin, Laminin und Kollagen I bestätigen.

Es ist interessant zu beobachten, daß schon in der ersten Gruppe der Hypertrophiepatienten die Fibrose, d.h. die Fibronectinexpression gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht war. Das bedeutet, daß die fibrotischen Veränderungen früher auftreten als die eigentlichen zellulären Merkmale der Hypertrophie, Zellvergrößerung und Degeneration. In späteren Stadien, beginnend mit Gruppe 2 und besonders deutlich in Gruppe 3 und den Patienten mit DCM, treten gleichzeitig intra-und extrazelluläre Veränderungen auf. Fibronectin spielt für die Entstehung der Fibrose in den hier untersuchten Patienten vermutlich eine wichtige Rolle, indem es die Fibroblasten zur Proliferation und zur Produktion von Zytokinen aktiviert. Außerdem spielt es durch Modifizierung von Migration und Adhäsion eine modulierende Rolle beim Umbau des Gewebes.

Es ist jedoch nicht nur Fibronectin, das vermehrt exprimiert wird, sondern andere extrazelluläre Matrixproteine sind gleichfalls beteiligt und sollen im folgenden Text besprochen werden.

#### **4.3.2. Laminin**

Laminin gehört zu der Gruppe der Anheftungsproteine und ist Bestandteil der Basalmembran.

##### *Molekulare Struktur*

Laminin ist ein großes Glykoprotein, das aus 3 Polypeptidketten aufgebaut ist. Die 3 Untereinheiten, als A, B1, B2 bezeichnet, haben ein Molekulargewicht von 400 kDa, 215 kDa und 205 kDa und sind über Disulfidbrücken verbunden.

Laminin besteht aus drei asymmetrischen, kreuzförmig angeordneten Polypeptidketten; für jede Kette sind verschiedene Isoformen bekannt und die Ketten bestehen aus sechs Domänen. Die kreuzartige Struktur der Laminin-Moleküle besitzen einen langen und drei kürzere Arme. Der lange Arm repräsentiert eine alpha-helicale Region, und setzt sich aus den drei oben beschriebenen Ketten zusammen. Er hat eine Länge von etwa 80 nm und besteht aus einer Sequenz von 589 Aminosäuren. Eine große globuläre Domäne befindet sich an einem Ende der Kette, gebildet aus der A- sowie 2 Carboxyl-Gruppen der B-Ketten, während sich N-terminal die 3 kurzen Arme befinden. Die 3 kürzeren Arme werden von je einer Kette gebildet. Es gibt gewebespezifische Laminin-Varianten, die sich aus verschiedenen Ketten zusammensetzen. Das aus dem Sarcomer zuerst

isolierte Laminin besteht aus den folgenden drei Ketten: A, B1, B2. Außerdem gibt es noch K-Laminin, S-Laminin und Merosin, bei dem die A-Kette durch die M-Kette ausgetauscht wurde <sup>81-83</sup>.

### *Lokalisation im Gewebe*

Laminin gehört zu den basalmembranständigen Glykoproteinen, die biologisch sehr aktiv sind und eine Vielzahl von Subtypen beinhalten <sup>82</sup>.

Es ist quantitativ das wichtigste, und häufigste nichtkollagene Matrixprotein der Basalmembran, hier bestehen enge Verbindungen mit Kollagen VI <sup>84</sup>. In der vaskulären Basalmembran bildet Laminin dazu noch Komplexe mit Entactin. Außerdem kann es an das Proteoglykan Heparansulfat und Nidogen binden.

### *Funktion*

Laminin ist ein multifunktionelles Protein mit verschiedenen biologischen Aktivitäten. Wie auch Fibronectin kann es das Zellwachstum, die Zelladhäsion, -morphologie, -migration und die Zellagglutination beeinflussen <sup>85</sup>.

Im Gegensatz zu Fibronectin, das eher für die frühe Differenzierung der Zellen verantwortlich zu sein scheint, spielt Laminin bei weiter fortgeschrittener Zelldifferenzierung eine Rolle. Es ist Voraussetzung für die endgültige Differenzierung und die endgültige Ausbildung spezieller Zellfunktionen <sup>86,87</sup>.

Zellkulturen auf Laminin-Substraten weisen eine gute Haftung für verschiedene Zelltypen, wie z.B. glatte Muskelzellen und Endothelien auf <sup>51,88</sup>. Diese Adhäsion scheint durch die RGD-Sequenz und Integrine der  $\beta$ 1-Familie vermittelt zu sein.

Laminin weist sowohl adhäsive als auch antiadhäsive Domänen auf <sup>89</sup>. Im Zusammenhang mit anderen Proteinen der ECM scheint es eher antiadhäsiv und auf die Zellmigration fördernd zu wirken <sup>85</sup>.

Der Antikörper markiert alle Basalmembranen, die entweder zu Kardiomyozyten, zu Endothelzellen oder zu glatten Muskelzellen gehören. Fibroblasten dagegen besitzen keine Basalmembran.

Durch seine Struktur ist Laminin in der Lage, das dreidimensionale Netzwerk der Basalmembran aufrechtzuerhalten, innerhalb der Basalmembran lagern sich die Lamininmoleküle über die kurzen Arme in Selbstorganisation aneinander. Dieses Geflecht, das neben Elastizität auch eine Grundfestigkeit besitzt, spielt eine wesentliche Rolle in der Formgebung und –erhaltung des einzelnen Myozyten sowie des gesamten Zellverbandes. Desweiteren stellt die Basallamina zum einen einen



hochselektiven Filter dar, der dadurch regulatorischen Einfluß auf die Polarität, die Differenzierung, den Metabolismus sowie die Funktion der Zelle nimmt und zum anderen eine Verbindungseinheit der extrazellulären Matrix und intrazellulären Strukturen darstellt.

Bei einer strukturellen Störung wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, kommt es vermutlich sowohl zu einem Verlust der globulären Bindungseigenschaften als auch der Fähigkeit der Selbstorganisation zu einem Netzwerk. Hieraus resultiert ein gestörter Aufbau der Basalmembran, der eine Einbuße der spezifischen Eigenschaften bedingt. Intrazellulär manifestiert sich dies vermutlich als metabolische Störung, in deren Folge es zu einem strukturellen Verlust des Myozyten kommt. Die extrazelluläre Matrix wird von den Zellen entkoppelt, sodaß ein Stabilitätsverlust oder bei stärkerer Ausprägung eine Auflösung des Zellverbandes beobachtet werden kann. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, daß sowohl bei den Hypertrophie-Gruppen als auch bei den Patienten mit DCM Laminin sehr ungeordnet und unregelmäßig war. Durch diese Strukturveränderung, die wahrscheinlich durch die ständige Überbelastung des Myokards zustande kam, kann der Aufbau der Basalmembran gestört werden und dadurch kann es zu den oben erwähnten Folgen kommen. Wir haben auch festgestellt, daß die Lamininexpression bei unseren Gruppen mit abnehmender EF zunahm, eine Tatsache, die bei der DCM-Gruppe am ausgeprägtesten war.

Die Zunahme von Laminin bewirkt eine Strukturveränderung in der Basalmembran, die neben dem Querdurchmesser die Eigenschaften als hochselektiver Filter betreffen. Als Konsequenz hieraus ergibt sich eine verlängerte Diffusionsstrecke sowie ein Verlust des spezifischen Substanz austausches zwischen Zellen und Extrazellularraum, der letztlich über die bereits oben erwähnten Mechanismen zu einer Myozytenschädigung führen kann <sup>85,90-93</sup>

#### **4.3.3. Kollagen I**

Die Kollagene sind eine Familie sehr charakteristischer Faserproteine, die bei allen vielzelligen Organismen vorkommen. Sie gehören zu den extrazellulären Strukturproteinen, die mit einem Anteil von 25% der Gesamtproteine die am stärksten repräsentierte Klasse darstellen. Bis heute wurden ungefähr 25 verschiedene Kollagen-Ketten und etwa 11 Kollagentypen nachgewiesen, von denen die Typen I-IV am besten charakterisiert sind.

### *Molekulare Struktur*

Die Kollagene setzen sich aus Polypeptidketten zusammen, die eine regelmäßige helikale Struktur bilden. Die Aminosäuren Prolin und Glycin spielen über Bildung von Wasserstoffbrücken eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Anordnung der dreisträngigen Helix, die eine Länge von 300 nm und einen Durchmesser von 1,5 nm besitzt. Diese dreisträngige Helix wird bei den einzelnen Kollagentypen aus gleichen oder unterschiedlichen Alpha-Ketten, die jeweils aus etwa 100 Aminosäuren bestehen, gebildet. Die Fibrillen stellen eine Zusammenlagerung der Kollagenmoleküle dar, die durch kovalente Querverbindungen untereinander die Reiß- und Zugfestigkeit deutlich erhöhen. Der Kollagenumsatz im Gewebe ist ein dynamischer Prozess, d.h. es findet ein ständiger Aufbau, der im normalen Myokard zu gleichen Anteilen erfolgt, statt. Die Fibroblasten sind sowohl der Syntheseort der Vorstufen des Kollagens als auch der spezifischen Kollagenasen und der Matrix-Metalloproteinase 1, die das Schlüsselenzym des Abbaus darstellt.

### *Lokalisation*

Kollagen I ist der häufigste Kollagentyp des menschlichen Körpers. Die Mikrofibrillen haben einen Durchmesser zwischen 20 und 100 nm.

Die häufigsten Kollagen-Typen im Herz sind Typ I und III <sup>94</sup>, welche im Extrazellularraum entweder als grobe oder feine Fibrillen existieren <sup>95</sup>.

Kollagen I hat die höchste Zugfestigkeit im Vergleich mit anderen Kollagentypen. Im Myokard werden auch andere Kollagentypen wie zum Beispiel Kollagentyp III, IV, V und VI gefunden. Die verschiedenen Merkmale der Kollagenfibrillen zusammen mit ihren Phänotypen und ihre Konzentration bestimmen die Steifigkeit der Ventrikel <sup>94</sup>.

### *Funktion*

Das Kollagen-Netzwerk besitzt multiple Funktionen, die für die Aufrechterhaltung und den Schutz der Gewebsarchitektur sowie der Ventrikelgeometrie wichtig sind. Die aus der strukturellen Anordnung resultierende Festigkeit und Steifigkeit des Maschenwerks schützt die einzelnen Bestandteile vor extremen Krafteinwirkungen.

Kollagen ermöglicht einen geordneten Gewebsaufbau durch Einflussnahme auf die Ausrichtung von Myozyten, Blutgefäßen sowie Lymphgefäßen. Factor et al. zeigten, daß die Myozyten durch endomyosiale Kollagenfasern miteinander oder mit ihren

Nachbargewebe (Gefäßen oder lymphatischen Kapillaren) verbunden sind, und durch diese Fasern die Myozytenrichtung aufrechterhalten bleibt <sup>96</sup>. Diese Funktion ist die bedeutsamste physiologische Aufgabe der myokardialen Kollagenmatrix.

### *Die Rolle des Kollagens bei kardialen Erkrankungen*

Infolge der chronischen Drucküberlastung bei Klappenfehlern kommt es im Myokard zum Remodeling im Interstitium und Fibrosebildung. Die Fibrose kann in Form einer Reparationsfibrose oder Reaktionsfibrose vorliegen. Reaktionsfibrose umfasst die perivaskuläre Fibrose und mediale Wandverdickung der intramuralen Widerstandgefäße. Die Reparationsfibrose wird als eine Adaptation zum Schutz der strukturellen Integrität bei Verlust von Myozyten verstanden. Bei beiden Formen ist im Vergleich zum gesunden Myokard der Anteil an Kollagen Typ I erhöht <sup>97,98</sup>.

Brilla et al. zeigten, daß Fibroblastenaktivität im Herz für die Ansammlung der Kollagentypen I und III verantwortlich ist. Dieses strukturelle Remodeling des myokardialen Interstitiums ist für die pathologische Hypertrophie verantwortlich <sup>99</sup>. Die disproportionierte Zunahme an Kollagen führt zu einer erhöhten Gewebefestigkeit und –steifheit einhergehend mit einem Verlust an Elastizität <sup>2,100-102</sup>. Daraus resultiert eine diastolische und systolische Compliance-Störung des Ventrikels <sup>103</sup>, und die koronare Reserve wird reduziert <sup>104</sup>. Bei unseren Untersuchungen haben wir zusätzlich zu Fibronectin das Kollagen I als zweites Fibrosezeichen bestimmt. Wir konnten die Befunde von Strauer und Pearlman bestätigen und zeigten, daß bei den Hypertrophie-Gruppen durch Dauerbelastung Kollagen Typ I stark erhöht war. Sogar bei der ersten Gruppe mit einer langjährigen Aortenstenose und Überlastung, jedoch einer noch normalen EF war das Kollagen vermehrt. Mit der Zunahme der Funktionseinschränkung des Herzens nahm das Kollagen zu, d.h. hier war auch, wie bei Fibronectin, eine EF-Abhängigkeit nachweisbar. Diese erhöhte Kollagen-Bildung kann zur Zunahme der Gewebefestigkeit und Steifigkeit führen, dadurch zur Beeinträchtigung der Ventrikelfunktion, die fortschreiten kann bis zur totalen Dysfunktion und Insuffizienz.

Die Untersuchungen an kardiomyopathischem Gewebe zeigten, daß diese Gruppe gleichfalls vermehrt Kollagen bildete und dadurch die Compliance des Ventrikels eingeschränkt war.

Man nimmt an, daß diese Veränderungen Folgen eines Ungleichgewichtes zwischen der Kollagenbildung und dem Kollagenabbau sind. Die Änderung des Kollagenumsatzes geschieht durch eine Modulation der Fibroblastenfunktion, die

multifaktoriell bedingt ist <sup>105</sup>. Nicht nur die Erhöhung der Steifigkeit der Ventrikel spielt eine Rolle, sondern durch die Fibrose wird auch die Distanz zwischen benachbarten Muskelfasern und zwischen Myozyten und Kapillaren vergrößert.

Auf diese Weise kommt es zur Umgestaltung des Interstitiums durch Fibrose <sup>101,102</sup>. Wir können diese Befunde (Kollagen und Fibronectin) bestätigen.

#### **4.3.4. Chondroitinsulfat**

Chondroitinsulfat ist das im Körper am häufigsten vorkommende sulfatierte Glykosaminglykan. Diese setzen sich aus Disacchariduntereinheiten zusammen, die dann lange Polysaccharidketten bilden. Die Polysaccharidketten sind oft hydrophil und durch Sulfatgruppen oft stark negativ geladen. Glucuronsäure und N-Acetylgalactosamin sind die Disaccharide von Chondroitinsulfat. Proteoglycane entstehen durch Kopplung von Glycosaminglycanen an Polypeptide. Der Proteinanteil dieser Makromoleküle entsteht im rauen endoplasmatischen Retikulum und wird auch als core-Protein bezeichnet. Im Golgi-Komplex erfolgt die Anlagerung der Disaccharideinheiten und die Sulfatierung .

Glykosaminglykane geben dem Gewebe eine feste Konsistenz. Sie spielen im Organismus u.a. eine wichtige Rolle bei der Induktion der Calcifizierung, der Wundheilung und für den Wassergehalt des Bindegewebes. Sie tragen ferner zur Kontrolle der Ionen- und Metabolitenkonzentrationen im Bindegewebe bei.

Chondroitinsulfat ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix in vielen Geweben. Man findet es im Mesenchym der Nabelschnur, in Knorpelgewebe, in Bindegewebsstrukturen der Skelettmuskulatur, in der glatten Muskulatur, sowie in fast allen Basalmembranen mit Ausnahme der glomerulären Basallamina <sup>106-108</sup>.

Die Studien von Anvur und Geiger haben gezeigt, daß Chondroitinsulfat in Zellkulturen sowohl auf der Zelloberfläche als auch in der Matrix, die die Zellen umgibt, in dichten, punktförmigen Strukturen vorkommt <sup>109</sup>.

Chondroitinsulfat scheint die Zelladhäsion eher zu hemmen. Werden beide, Fibronectin und Chondroitinsulfat, gemeinsam als Substrat benutzt, haften die Zellen weniger stark, als auf Fibronectin allein <sup>110,111</sup>. Chondroitinsulfat spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und der Zusammensetzung von elastischen Fasern durch glatte Muskelzellen wie Hinek et al. gezeigt haben. In der gleichen Studie zeigten sie, daß eine verstärkte Chondroitinsulfatexpression diesen Prozess empfindlich beeinträchtigen kann <sup>112,113</sup>.

Wir haben die Expression von Chondroitinsulfat in unseren Gruppen verglichen, und konnten auch hier eine Zunahme mit stärkerer EF-Einschränkung feststellen. Diese Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese, daß eine deutliche Zunahme aller Komponenten der extrazelluläre Matrix (Fibrose), zu denen besonders Fibronectin, Laminin, Kollagen I und Chondroitinsulfat gehören, zur Einschränkung der linksventrikulären Funktion und der damit verbundenen Abnahme der EF führen.

#### **4.4. Adhäsionsmoleküle und Blutzellen**

Die gegenseitige Beeinflussung zweier Zellen und die Kommunikation zwischen einer Zelle und ihrer extrazellulären Matrix spielt für die Immunantwort des Organismus eine große Rolle. Die sogenannten Adhäsionsmoleküle sind für das Abwehrsystem von entscheidender Bedeutung. Es handelt sich um Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder der Plasmamembran –meist Glykoproteine- mit vielfältigen Aufgaben. Diese auf Endothelzellen, Epithelien, Leukozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Keratozyten und vielen anderen Zellen nachweisbaren Moleküle beeinflussen in einem komplizierten Zusammenspiel mit Zytokinen z.B. die zelluläre Zusammensetzung eines entzündlichen Infiltrates, den Übergang von einer akuten in eine chronische Entzündung oder den Ablauf einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation. Seit längerem bekannte Adhäsionsmoleküle sind die HLA-Moleküle des MHC-Komplexes, der T-Zellrezeptor (CD3) oder das T4- (CD 4) und T8-Molekül (CD 8) auf T-Lymphozyten. Die Möglichkeit, Endothelzellkulturen mit Hilfe monoklonaler Antikörper zu untersuchen, beschleunigte die Entdeckung neuer Rezeptoren, die Identifizierung der dazugehörigen Liganden und nach Entschlüsselung des Genoms die rekombinante Synthese der Moleküle <sup>114</sup>. Anhand ihrer Molekularstruktur lassen sich die Adhäsionsmoleküle in drei Familien einteilen: 1. Immunglobulin-Familie, 2. Integrine und 3. Selektine <sup>115</sup>. Rezeptor-Liganden-Paare können gleichen oder verschiedenen Familien angehören. Für viele Moleküle existieren mittlerweile mehrere Bezeichnungen und eine Zuordnung zu einem "Cluster of Differentiation" (CD). Adhäsionsmoleküle bilden Rezeptor-Liganden-Paare, über die ein spezifischer Zellkontakt hergestellt oder verstärkt wird. So regulieren z.B. ICAM-1 und LFA-1 die Interaktion zwischen allen Leukozyten (LFA-1) und ihrer Zielzelle (ICAM-1), sei es das Endothel, eine zu lysierende Zelle oder ein anderer Leukozyt <sup>116-118</sup>.

In der folgenden Arbeit sollten die für die Immunabwehr wichtigen Adhäsionsmoleküle untersucht und für die einzelnen Patientengruppen verglichen und ausgewertet werden. Die Markierungen mit PECAM wurden benutzt, um die Kapillardichte zu bestimmen. Die Ergebnisse werden auf den folgenden Seiten diskutiert.

#### 4.4.1. CD31 (PECAM)

##### *Struktur*

CD31 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und hat ein Molekulargewicht von 100 kDa in Endothelzellen und von 130 kDa in Thrombozyten.

##### *Lokalisation*

Wie die Untersuchungen von Scholz et al. zeigten, wurde in vivo PECAM gleichmäßig auf der Plasmamembran aller vaskulären Endothellzellen, vorwiegend auf der luminalen Seite der Gefäße, gefunden. Auf der Seite der Zell-Zell-Kontakte dagegen fand man keine spezifische Vermehrung. In vitro zeigten isolierte menschliche Endothelzellen der Umbilikalvene eine fortlaufende Markierung der gesamten Zellmembran <sup>119</sup>. Außer auf den intrazellulären Verbindungsstellen der Endothelzellen wurde PECAM auch auf den neutrophilen Granulozyten, auf der Oberfläche der zirkulierenden Leukozyten und der Thrombozyten gefunden <sup>120,121</sup>.

##### *Funktion*

Die Untersuchungen von DeLisser zeigten, daß CD31 komplexe Verbindungen eingehen kann. Die ausgeprägte Verteilung von PECAM auf den vaskulären Zellen zeigt, daß dieses Molekül physiologisch eine wichtige Rolle spielt <sup>122,123</sup>.

CD31 ist ein vaskuläres Zelladhäsions- und Signalmolekül, das bei der Rekrutierung von Neutrophilen in Entzündungsgebieten mitwirkt. Im Gegensatz zur verbreiteten Hypothese, daß PECAM nur auf Zell-Zell-Kontaktstellen sitzt, zeigten mehrere Untersuchungen die Anwesenheit auf der gesamten Zellmembran. So geht man davon aus, daß PECAM eine stabilisierende Wirkung auf die Endothelzellen hat <sup>119</sup>.

Die Adhäsion von PECAM erfolgt durch seine N-Terminale, Ig-ähnliche Domäne, allerdings ist es noch unklar, welche Sequenzen in dieser Domäne dafür erforderlich sind <sup>124</sup>.

Die adhäsiven Interaktionen der Endothelzellen miteinander und auch die Adhäsionsrezeptoren, die diese Interaktionen vermitteln, sind wahrscheinlich eine wichtige Grundlage für Angiogenese-Prozesse <sup>120</sup>.

In dieser Arbeit haben wir CD31 als Marker der Endothelzellen benutzt und so das Verhältnis zwischen Kapillaren und Myozyten untersucht.

Bei der Entwicklung der Hypertrophie bleibt das Verhältnis Herzmuskelzellen zu Kapillaren 1:1 erhalten, jedoch kommt es zu einer Vergrößerung des Kapillarabstandes und damit zu einer schlechteren Sauerstoffversorgung des Myokards. Wir konnten dies in unserem Untersuchungsgewebe nachweisen. Bei allen Gruppen haben wir im Vergleich zu der Kontrollgruppe weniger CD31-markierte Zellen gezählt. In den Hypertrophie-Gruppen hatten Gruppe 1 und 2 gleich viele Markierungen und bei Gruppe 3 waren die markierten Zellen signifikant vermindert. Dies stimmt auch mit den Fibrosewerten überein. Je mehr Fibrose, desto größer die Kapillarabstände. Diese verminderte Perfusion trägt zur Funktionsminderung bei.

#### **4.4.2. CD54 (ICAM)**

Die Moleküle, die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Zell / Zell-Adhäsion verantwortlich sind, gehören in ihrer Mehrzahl zu der großen, entwicklungsgeschichtlich alten Protein-Superfamilie der Immunglobuline (Ig); sie tragen diese Bezeichnung, weil sie mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Domäne besitzen, und solche Domänen sind auch für die Antikörpermoleküle charakteristisch. Ein Beispiel hierfür ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM) <sup>125,126</sup>.

ICAM oder CD54 ist ein 90 kD Glykoprotein, das zur Immunglobulinsuperfamilie gehört.

Es ist ein Ligand von Lymphocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1), ein alpha-beta-Komplex, der zu der Integrinfamilie der Zell-Zell und Zell-Matrix Rezeptoren gehört. ICAM-1 ist auf einer 3,3 kB mRNA kodiert.

Es ist ein integrales Membranprotein mit einer extrazellulären Domäne, die aus 5 wiederholten Immunglobulinähnlichen Domänen besteht. Im Gegensatz zu anderen Integrinliganden, besitzt ICAM-1 keine RGD-Sequenzen <sup>127</sup>.

ICAM wird stark auf der Oberfläche verschiedener Zellen präsentiert wie z.B. Monozyten und Granulocyten und auf Lymphocyten.

Es wird ebenfalls auf aktivierten Endothelzellen exprimiert, bindet dort an Integrine auf der Oberfläche weißer Blutzellen und trägt so dazu bei, diese Zellen an einer entzündeten Stelle festzuhalten <sup>125,126</sup>.

Die Untersuchungen von Roebuck zeigten, daß ICAM-Interaktionen mit den  $\beta 2$  Integrinen auf der Leukozytenoberfläche sehr wichtig für ihre transendotheliale Migration zum entzündeten Bereich sind. ICAM wird an der Zelloberfläche präsentiert und reguliert die Antwort auf inflammatorische Mediatoren <sup>128</sup>

CD54 spielt auch eine Schlüsselrolle in Zell-Zell-Interaktionen, die zu Immunantworten führen. Die Untersuchungen von Maio et al. zeigten, daß die ICAM-Antigene in der Anfangsphase der normalen hämatopoetischen Zellentwicklung und während der Aktivität der Blutzellen dominant exprimiert sind. In der gleichen Arbeit konnte man zeigen, daß CD54 eine starke Expression auf neoplastischen "Stammzellen" und dem lymphatischen Keimzentrum zeigt, und damit eine prognostisch wichtige Rolle in onkohämatologischen Erkrankungen spielt <sup>129</sup>.

In unseren Experimenten haben wir CD54- (ICAM) wie CD31-AK (PECAM) für die Markierung der Endothelzellen und somit der Kapillaren eingesetzt.

In gesundem Myokard präsentierten sich viele markierte Kapillaren, die auch normal aufgebaut waren. Die Kapillaren nahmen in den Hypertrophiegruppen ab, und zeigten auch sehr unregelmäßigen Aufbau. Hier gab es auch zwischen Gruppe 1 und 2 kaum Unterschiede, aber eine signifikante Verminderung bei Gruppe 3 war deutlich.

Devaux et al haben in ihren Untersuchungen an transplantiertem Gewebe, ICAM-1 als einen Indikator für chronische Inflammation benutzt. Sie konnten zeigen, daß PECAM-1 alle Endothelzellen und ICAM-1 etwa 80% der Kapillaren in Kontrollgewebe markieren. Außerdem waren die markierten Zellen im Versuchsgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht <sup>130</sup>.

Unsere Untersuchungen haben diese Ergebnisse bestätigt. Wir konnten auch zeigen, daß in der DCM-Gruppe im Vergleich zu unserer Kontrollgruppe die Zahl der markierten Zellen signifikant anstieg. Das beweist, daß diese chronische Entzündungsreaktion zur strukturellen Verschlechterung, die die Basis der Herzinsuffizienz ist, beiträgt.

#### **4.4.3. CD68**

CD68 ist ein großes lysosomales Membranprotein, welches zur Familie der Glykoproteine gehört. Es hat ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa. CD68-Antikörper reagieren mit Makrophagen und Dendritzellen <sup>131</sup>.

Etwa 5000 Moleküle von CD68 werden auf der Zelloberfläche eines menschlichen Makrophagen präsentiert. Makrophagen sind im menschlichen Gewebe weit verbreitet, wie z.B. Kupferzellen, Makrophagen in der roten Pulpa der Milz, in der Lamina Propria der Lungenalveolen und im Knochenmark <sup>132</sup>.



Makrophagen haben eine wichtige Funktion bei der Beseitigung alter und beschädigter Zellen und ihrer Überreste. Welche Rezeptoren auf den Makrophagen überalterte, geschädigte oder tote Zellen erkennen ist nicht genau bekannt, allerdings scheinen in einigen Fällen Zelladhäsions-Proteine der Integrin-Familie beteiligt zu sein.

Das Vorhandensein von zahlreichen aktivierten Makrophagen im Interstitium von Myokardgewebe mit dilatativer Kardiomyopathie konnte im Vergleich zum gesunden Myokard von Schaper et al. gezeigt werden <sup>30</sup>.

In unseren Untersuchungen konnten wir dieses Ergebnis bestätigen, daneben konnten wir zeigen, daß auch bei hypertrophiertem Myokard im Vergleich zu gesundem die Zahl von markierten Makrophagen zunahm. Unsere Ergebnisse zeigten, daß die Dauerbelastung des linken Ventrikels zu Remodeling des Myokards und Sequestrierung von Zellbestandteilen in den extrazellulären Raum führt. Als Antwort auf diese Veränderungen werden die Makrophagen zur Phagozytose und zu erhöhter Produktion von Fibronektin stimuliert.

#### **4.4.4. CD45**

CD45 (Leukocyte Common Antigen) ist ein transmembranäres Glykoprotein, das auf der Oberfläche weißer Blutkörperchen exprimiert wird. CD45 hat ein Molekulargewicht von 200 kDa, und kann mehr als 10% der Oberfläche von Zellen einnehmen.

CD45 besitzt verschiedene Isoformen, die durch unterschiedliches Splicing von Exons zustande kommen. Diese Exons existieren auf der extrazellulären Domäne <sup>133</sup>.

CD45 besitzt eine einfache transmembranäre Region und eine große zytoplasmatische Domäne.

CD45 ist ein Glykoprotein, das die Membran einmal durchspannt. Seine Tyrosinphosphatase-Domäne ist zur cytosolischen Seite hin orientiert. Wird das Protein an der Zelloberfläche durch Antikörper quervernetzt (der natürliche Ligand ist nicht bekannt), so wird die katalytische Domäne in der Zelle dazu aktiviert, Phosphatgruppen von Tyrosin-Resten spezifischer Zellproteine zu entfernen. Ein solches Zielprotein ist wahrscheinlich die Tyrosinkinase Lck. Die Dephosphorylierung durch CD45 bewirkt, daß Lck andere Proteine in der Zelle phosphoryliert <sup>134,135</sup>.

CD45 ist bei der Antwort auf IL-2 und seine Rezeptoren beteiligt <sup>136</sup>.

Wie bereits erwähnt, wird CD45 auf der Oberfläche von Leukozyten präsentiert und kann durch CD45 Antikörper markiert werden. Es ist bekannt, daß eine örtliche Entzündung oder Verletzung im Gewebe schnell Leukozyten in das betroffene Gebiet lockt. Das ist Teil der Entzündungsantwort, die bei der Infektionsbekämpfung und Wundheilung essentiell ist. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, daß die Anzahl der CD45 markierten Zellen in hypertrophiertem Gewebe und DCM-Gewebe im Vergleich zu gesundem Myokard zunahm. Auch in einzelnen Gruppen, abhängig von EF und Herzfunktion, waren die CD45-Markierungen vermehrt; d.h. je kleiner der EF-Wert desto höher die Anzahl der CD45 Markierungen. Diese Befunde deuten, übereinstimmend mit den CD54 Daten auf das Vorhandensein einer chronischen, geringgradigen unspezifischen Entzündung hin. Diese wird vermutlich durch den kontinuierlichen Degenerationsprozeß im dauerhaft überlasteten Myokard aufrecht erhalten.

#### **4.4.5. CD3**

##### *Struktur*

Der CD3-Komplex wird aus 6 Polypeptiden mit 4 verschiedenen Ketten gebildet, zusätzlich kommen drei unterschiedliche Dimere in seinem Aufbau vor. Die CD3-Ketten enthalten in ihrer extrazellulären Region eine einzelne immunglobulinähnliche Domäne und damit gehören sie auch zur Immunglobulin-Superfamilie. In der zytoplasmatischen Domäne bestehen die CD3-Ketten aus Immunrezeptor-Tyrosin- Based-Activation-Motif ( ITAM) <sup>137</sup>.

##### *Lokalisation*

Der T-Zellrezeptorkomplex (TCR) setzt sich aus TCR  $\alpha$   $\beta$ -Heterodimer zusammen und assoziiert mit CD3-Komplexen <sup>138</sup>. So kann man sagen, daß CD3 in allen peripheren T-Zellen exprimiert wird. Zusätzlich sind sie auf den reifen Thrombozyten, und NK-Zellen im Zytoplasma nachweisbar <sup>139</sup>. Bei Patienten mit Kardiomyopathie wurde eine große Subpopulation von T-Lymphozyten gefunden, die eine hohe Dichte von CD3 tragen <sup>140</sup>.

##### *Funktion*

Die Aktivierung einer cytotoxischen oder einer Helfer-T-Zelle ist ein sehr komplizierter Prozeß. Der T-Zellrezeptor-Heterodimer erkennt fremde Peptide, die an MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Zielzellen gebunden sind. Dieser

Rezeptor ist -wie bei B-Zellen der Fall- mit einer Reihe von invarianten Transmembran Polypeptid-Ketten assoziiert, die man „CD3-Komplex“ nennt und die das extrazelluläre Bindungs-Ereignis in ein intrazelluläres Aktivierungs-Signal umwandeln. Dabei aktiviert der CD3-Komplex ein oder mehrere Mitglieder der src-Familie von Tyrosinkinasen, wie etwa das Fyn-Protein. Diese Enzyme sollen dann verschiedene zelluläre Proteine phosphorylieren, unter anderem auch den CD3-Komplex selbst, sowie das Enzym Phospholipase C, das dann seinerseits die Inositol-Phospholipid-Signal-Ketten aktiviert<sup>141,142</sup>.

In dem Zytoplasma von T-Zellen ist der CD3-Komplex in der Transduktion von Antigen-Erkennungssignalen, und in der Regulation der Zelloberflächenexpression des TCR-Komplexes beteiligt. Der CD3-Komplex spielt auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Thrombozyten bei Bildung eines zuvor unbekannten pre-TCR-Komplexes und eines Kolontyp-abhängigen CD3 auf den reifen Thrombozyten <sup>143</sup>.

Anti-CD3 besitzt in vivo potente immunsuppressive Eigenschaften, und hat einen eindrucksvollen Effekt bei Behandlung und Prophylaxe von Nieren-, Herz- und Leber-Transplantatabstoßungen <sup>144,145</sup>.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die CD3 positiv markierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch gezählt. Im Vergleich zu gesundem Myokardgewebe fanden wir eine erhöhte Anzahl positiver Zellen bei den Hypertrophien und auch im Kardiomyopathie-Gewebe. Dies zeigte, daß mit Einschränkung der Herzfunktion aufgrund von Aortenstenose oder Kardiomyopathie die Zahl der T-Lymphozyten zunahm. Mit dem CD3 Antikörper werden sowohl die Helfer-T-Zellen als auch die cytotoxischen T-Zellen erfaßt. Die Funktion der Helfer-T-Zellen besteht darin, die Aktivitäten anderer weißer Blutzellen zu verstärken. Im Gegensatz dazu sind die cytotoxischen T-Zellen unmittelbar an der Abwehr von Infektionen beteiligt. Sie vernichten infizierte Zellen sofort. Dies zeigt, daß die T-Lymphozyten an der Immunantwort des Gewebes beteiligt sind. Eine Zunahme von T-Lymphozyten im hier untersuchten Gewebe bestätigte unsere Hypothese, daß das geschädigte Myokard, hier aufgrund langjähriger Aortenstenose oder Kardiomyopathie, einen Immunabwehr-Mechanismus auslöst, und daher die Zahl der Markierungen vermehrt waren. Allerdings konnten wir auch zeigen, daß die Zahl von Markierungen in dilatativem Kardiomyopathie- Gewebe höher als bei anderen Gruppen war. Es scheint also ein Zusammenhang mit der Schwere der Herzinsuffizienz zu bestehen. Die leichte Zunahme von CD3-markierten Zellen waren ein Zeichen für leichte Entzündung in Myokard. Nach Dallas-Kriterien liegt dann eine Myokarditis vor, wenn die Anzahl von CD3-markierten Zellen mehr als 5 sind. Bei unsere Untersuchungen

lagen aber diese unter 5. Dies bestätigte unsere Annahme, daß einer chronischen geringgradigen unspezifischen Entzündung, aufrechterhalten durch den kontinuierlichen Degenerationsprozeß im dauerüberbelasteten Myokard, vorhanden ist.

#### **4.5. Wachstumsfaktor**

Ein Wachstumsfaktor ist ein polypeptidisches Signalmolekül, das eine Zelle zum Wachstum oder zur Proliferation anregt. Es existieren über 50 bekannte Proteine, die als Wachstumsfaktoren arbeiten. Für jeden Typ von Wachstumsfaktor gibt es einen spezifischen Rezeptor oder eine Kombination von Rezeptoren, die von einigen Zellen auf ihrer Oberfläche ausgebildet werden. Zellen sprechen nur auf einen bestimmten Protein-Wachstumsfaktor an, wenn sie das entsprechende Rezeptor-Protein für diesen Faktor in ihrer Plasmamembran enthalten. Neben den Proteinen können auch andere Molekülklassen als Wachstumsfaktoren dienen, wie z.B. Steroide, die als intrazelluläre Rezeptorproteine arbeiten. Wachstumsfaktoren werden in weit- und eng-spezifizierte Klassen eingeteilt. Weitspezifizierte Faktoren, wie der PDGF wirken auf viele Zellarten. Das extreme Gegenteil stellen eng-spezifizierte Faktoren dar, wie zum Beispiel das Erythropoetin, das nur zur Proliferation der Vorstufen der roten Blutkörperchen führt.

Die Proliferation der meisten Zellarten eines Organismus hängt nicht von einem einzigen Wachstumsfaktor ab, sondern von einer bestimmten Kombination dieser Substanzen. Daher könnte in einem höheren Organismus eine kleine Gruppe von Wachstumsfaktor-Familien in verschiedenen Kombinationen selektiv die Proliferation von jeder unterschiedlichen Zellart regulieren.

Obwohl einige Wachstumsfaktoren im Blut zirkulieren, stammen die meisten jedoch von anderen Zellen der Umgebung und wirken lokal als chemischer Überträger. Zusätzlich zu den Wachstumsfaktoren, die die Zellteilung stimulieren, gibt es Substanzen, die auf bestimmte Zellen wirken, sie stimulieren oder hemmen in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Das ist der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Tatsächlich haben die meisten Wachstumsfaktoren neben der Regulierung von Zellwachstum und Teilung eine Vielzahl weiterer Aufgaben: sie kontrollieren, in Abhängigkeit von den Begleitumständen, die Vermehrung, das Überleben, die Differenzierung, die Bewegung oder die Funktion von Zellen <sup>146-149</sup>.

#### 4.5.1. Transforming Growth Factor $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )

##### *Molekulare Struktur*

TGF- $\beta_1$  hat ein Molekulargewicht von 25 kDa und besteht aus 112 Aminosäuren. Es besitzt drei aktive Isoformen, R1, R2 und R3, wobei die Isoformen R1 und R2 höhere Aktivitäten besitzen als R3 .

Die TGF- $\beta$  Familie enthält eine Amino-Terminal-Signal-Sequenz, die für den Export aus den Zellen verantwortlich ist. Der Nachweis von Mutationen konnte beweisen, daß diese Region für korrekte Faltung und Sekretion notwendig ist <sup>150</sup>.

Diese Überfamilie wird auf der Basis der homologischen Sequenzen der Maturpeptide in verschiedene Unterfamilien aufgeteilt, wie z.B. TGF- $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  ebenso TGF- $\beta_4$  in Pavianen und  $\beta_5$  in Xenopus. Die drei TGF- $\beta$ -Isoformen der Säugetiere gleichen sich zu über 70% <sup>151,152</sup>. Auf diese Weise haben die meisten Zellsysteme eine gleiche biologische Aktivität. Jedoch ist ihre räumliche Verteilung und ihr Expressionsmuster sowohl in der Embryoform als auch in der Adultform deutlich verschieden <sup>153-155</sup>. TGF- $\beta$  hat insgesamt 25 verschiedene Mitglieder. Alle Mitglieder sind Proteine mit ähnlicher Struktur und ähnlicher Funktion <sup>149</sup>.

Die TGF- $\beta$ -Faktoren werden als größere Vorläufermoleküle synthetisiert und als inaktive Komplexe aus der Zelle ausgeschleust, die erst später durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Viele andere extrazelluläre Signalproteine sind strukturell mit den TGF- $\beta$ -Faktoren verwandt. Dazu gehören die *Aktivine*, die in Wirbeltieren für die Bildung des Mesoderms wichtig sind <sup>147,148</sup>.

##### *Lokalisation*

TGF- $\beta$  findet man in den meisten Geweben in Form eines latenten hochmolekularen Komplexes, der in den experimentellen Studien durch Säure, Wärme oder proteolytische Enzyme aktiviert werden kann. Man geht davon aus, daß auch Plasmin (=natürliche Protease) diesen latenten Komplex aktivieren können <sup>156</sup>.

TGF- $\beta$  ist auch in Thrombozyten vorhanden. Es kann allerdings auch von Muskel- und Endothelzellen gebildet werden .

TGF- $\beta$ , ein allgegenwärtiges Wachstumssteuerungsprotein, kann sich an den Proteinkern von mehreren Proteoglykanen der Matrix binden. Diese Bindungen hemmen die Aktivität von TGF- $\beta$ . Das Betaglykan hält TGF- $\beta$  fest und präsentiert es den zugehörigen Rezeptoren <sup>156,157</sup>.

### *Funktion*

Die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ) stellen eine Familie lokaler Mediatoren dar, die das Zellwachstum und die Funktion der meisten Wirbeltierzellen regulieren. Ihr Einfluss auf die Zellen ist unterschiedlich. Je nach Zelltyp können sie hemmend auf das Wachstum oder stimulierend auf die Synthese von extrazellulären Komponenten, wie zum Beispiel die Knochenbildung, wirken. Sie können auch manche Zellen chemotaktisch anlocken <sup>147-149</sup>.

TGF- $\beta_1$  kann auch bei der Zellproliferation, Genexpression, Adhäsion, Migration und Angiogenese mitwirken <sup>158</sup>.

Es kann als ein immunsuppressives Mittel wirken <sup>159</sup>.

TGF- $\beta$  spielt bei einer Reihe von Entwicklungen und Differenzierungen im Gewebe eine wichtige Rolle <sup>160</sup>. Es hat durch seine Beteiligung an kardiovaskulärer Organogenese und Krankheiten in letzter Zeit sehr viel an Aufmerksamkeit gewonnen <sup>161</sup>.

Es ist ein wichtiger Regulator für die in der Matrix produzierten Proteoglykane, Kollagene, und Fibronektine; außerdem reguliert es die Expression von deren Rezeptoren <sup>162,163</sup>.

TGF- $\beta$  Isoformen haben ein komplexes Muster und zeigen Interaktionen mit verschiedenen Membranrezeptorkomponenten. Die Aktivierung dieser Rezeptoren wirkt inhibitorisch auf Epithelzellproliferation. TGF- $\beta$ -Rezeptoren sind mit den Mechanismen gekoppelt, die die Expression von differenzierungskodierten Genen und verschiedenen Zellfunktionen kontrollieren <sup>164</sup>.

TGF- $\beta_1$  ist ein wichtiges regulierendes Zytokin, das an Gewebereparatur beteiligt ist <sup>161,165,166</sup>. Es unterstützt die Entstehung von Fibrose im Gewebe <sup>167</sup>. TGF- $\beta_1$  kann die Expression von sechs myokardialen Genen ( $\beta$ -MHC, Skelettmuskel  $\alpha$ -Aktinin, Glatt-Muskel  $\alpha$ -aktinin, MHC und sarkoplasmatisches Retikulum ATPase) verändern <sup>166,168</sup>.

### *Die Rolle von TGF- $\beta_1$ bei kardialen Erkrankungen*

Parakrine Faktoren induzieren die Expression von TGF- $\beta$  während der kardialen Organogenese. Mehrere experimentelle Arbeiten haben gezeigt, daß TGF- $\beta$  an kardialer Muskelbildung, sowie Muskeldifferenzierung beteiligt ist <sup>155</sup>. Auch in den embryonalen Zellen von Mäuse-Zellkulturen konnte man nachweisen, daß die kardiale Muskelbildung durch TGF- $\beta_1$  und 2 zunimmt <sup>169</sup>.

Intravenöse Injektion von Anti-TGF- $\beta_1$  reduziert signifikant die myokardiale Nekrose und verhindert die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen <sup>170</sup>.

TGF- $\beta_1$  spielt eine Rolle in der Fibroblastenproliferation und der Sezernierung extrazellulärer Matrix bei malignen Herzerkrankungen <sup>171</sup> und bei Myokardinfarkten <sup>172,173</sup> durch Hypertrophie induzierende Stimuli <sup>174,175</sup>, sowohl in Tiermodellen als auch bei menschlichen Herzerkrankungen<sup>176,177</sup>. In unseren Untersuchungen haben wir gezeigt, daß in Gewebe, mit vermehrter Fibrose auch vermehrt TGF- $\beta_1$  gemessen wurde. Dies bestätigt die Annahme, daß TGF- $\beta_1$  die extrazelluläre Matrix und ihre Komponenten stimuliert und deren Expression unterstützt.

Pathophysiologisch ist der Anstieg von TGF- $\beta_1$  ein kritischer Faktor im weiter fortschreitenden Verlauf fibrotischer Erkrankungen <sup>167,178</sup>. Entsprechend könnte das Antagonisieren mit Anti-TGF- $\beta_1$ -AK <sup>179</sup> oder der Einsatz von Proteoglykanen, die TGF- $\beta_1$  binden <sup>167</sup>, eine effektive Hemmung der Gewebsfibrosierung bewirken.

Im hypertrophierten Herzen ist die Fibrosierung des Myokards der Hauptgrund für die kardiale Dysfunktion.

Im Herzen spielt TGF- $\beta_1$  eine bedeutende Rolle bei der Regulierung und Expression von ECM-Proteinen, und es verstärkt die Produktion von Fibronektin, Kollagen und Proteoglykanen <sup>180,181</sup>. TGF- $\beta_1$  ist in der Lage, den Matrixabbau zu blockieren, indem es die Synthese von Proteasen hemmt und gleichzeitig die Proteaseinhibitoren stimuliert <sup>182,183</sup>.

Brooks et al konnten die Einwirkung von TGF- $\beta_1$  auf altersabhängige myokardiale Fibrose zeigen. Für diesen Zweck untersuchten sie TGF- $\beta_1$ -heterozygot mutierte Mäuse. Sie zeigten, daß die Herzen der mutierten Mäuse weniger Fibrose und somit eine vermehrte Compliance und eine verminderte myokardiale Steifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe haben. Es scheint, als ob das Verlieren eines TGF- $\beta_1$  Allels, eine Verbesserung der altersabhängigen Myokardfibrose und der LV-Compliance mit sich bringt <sup>184</sup>. Wir haben in unseren Untersuchungen die Einwirkung von TGF- $\beta_1$  in hypertrophierten Herzen untersucht und konnten die oben erwähnten Ergebnisse bestätigen. In dem hier untersuchten Material fanden wir auch EF-abhängige TGF- $\beta_1$ -Expression, das heißt, je niedriger die EF und je eingeschränkter die kardiale Funktion, um so stärker die TGF- $\beta_1$  Intensität, und somit der Fibrosegehalt.





## 5. Zusammenfassung

Viele experimentelle Untersuchungen haben sich in letzten Jahren mit den charakteristischen Funktions- und strukturveränderungen des insuffizienten Herzens befasst. Der Verlauf und besonders der letzte Schritt von der kompensierten Herzhypertrophie zum Herzversagen ist aber immer noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit befassten wir uns mit diesen Thema. Das Ziel unsere Arbeit war es, die Rolle der zellulären Degeneration, Fibrose, inflammatorischen Reaktionen, und Wachstumsfaktoren im Verlauf fortschreitenden Herzinsuffizienz zu ermitteln.

Dafür haben wir gut definierte Gruppen aus 44 Patienten mit Hypertrophie infolge einer lang bestehenden Aortenklappenstenose untersucht. Diese wurden aufgrund ihrer präoperativen Ejektionsfraktion (EF) in drei Gruppen unterteilt; 12 Patienten (DCM), die infolge einer dilatativen Kardiomyopathie eine Herzinsuffizienz entwickelten (EF < 20%) und eine Kontrollgruppe wurde ebenfalls untersucht.

Die immunhistochemische Färbungen mit Antikörper gegen Desmin, zeigten, daß die gleichmäßige Querstreifung die bei normalem Gewebe vorhanden ist, bei unserem Untersuchungsgewebe gestört war oder sogar ganz fehlte. Da Desmin für die Stabilisation und den Schutz des Muskels verantwortlich ist, war diese Funktion bei unserem Untersuchungsgewebe nicht mehr gewährleistet und das kontraktile Material reduziert, was auf intrazelluläre Degeneration deutete.

Wir konnten nachweisen, daß die extrazellulären Matrixproteine in den Patientengruppen im Vergleich zu gesundem Gewebe starken Veränderungen unterliegen. Fast alle Proteine, die wir untersuchten, werden in der Hypertrophie-, und DCM-Gruppe stärker exprimiert, als in der Kontrollgruppe. Die beeindruckendsten Veränderungen zeigt hier Fibronektin, das als Maß für Fibrose benutzt wurde. Wir fanden in dem hier untersuchten Material eine EF-abhängige Degeneration. Weiterhin war der Fibrosegehalt umso stärker erhöht, je niedriger die EF war. Wir stellen fest, daß die Fibrose zwischen Gruppe 1 und 2 fast gleich aber in Gruppe 3 signifikant erhöht war.

Auffallend war außerdem, daß schon in der ersten Gruppe der Hypertrophiepatienten die Fibrose, d.h. die Fibronektinexpression, gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht war. Das bedeutet, daß die fibrotischen Veränderungen früher auftreten als die eigentlichen zellulären Merkmale der Hypertrophie, Zellvergrößerung und Degeneration. In späteren Stadien, beginnend mit Gruppe 2 und besonders deutlich in Gruppe 3 und den Patienten mit DCM, treten gleichzeitig intra-und extrazelluläre Veränderungen auf. Fibronektin spielt

für die Entstehung der Fibrose in den hier untersuchten Patienten vermutlich eine wichtige Rolle, indem es die Fibroblasten zur Proliferation und zur Produktion von Zytokinen aktiviert. Außerdem spielt es durch Modifizierung von Migration und Adhäsion eine modulierende Rolle beim Umbau des Gewebes.

Ähnliche Ergebnisse zeigten teilweise auch andere hier untersuchte extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen I, Laminin und Chondroitinsulfat. Die Zunahme der extrazellulären Matrix-Proteine trägt zur Erhöhung der zellulären Festigkeit des einzelnen Kardiomyozyten bei und beschränkt die Compliance des Herzens. Außerdem haben wir festgestellt, daß Laminin in hypertrophierten- und DCM-Geweben vermehrt und ungeordnet war und damit die Funktion der Basalmembran beeinträchtigt wurde.

Wir haben auch verschiedene Adhäsionsmoleküle und Blutzellen untersucht. CD31 (PECAM) und CD54 (ICAM) haben wir als Marker der Endothelzellen benutzt und so das Verhältnis zwischen Kapillaren und Myozyten untersucht. Wir konnten zeigen, daß durch Fibrose der Abstand zwischen Kapillaren, abhängig von Fibrosegrad und EF, zunahm und so auch die Anzahl von markierten Zellen mit PECAM und ICAM bei den Hypertrophie-Patienten im Vergleich zu Gesunden abnahm. Die für die Immunabwehr wichtigen Adhäsionsmoleküle wie CD68 für Makrophagen-, CD45 für Leukozyten und CD3 für T-Zellen wurden auch untersucht. Bei diesen Molekülen konnten wir eine Zunahme von markierten Zellen in hypertrophiertem Gewebe und DCM-Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Es war interessant zu beobachten, daß auch zwischen den einzelnen Hypertrophiegruppen, abhängig von der EF und Dauer der Belastung, eine Zunahme der Markierungen vorhanden war. Diese Befunde deuten auf das Vorhandensein einer chronischen geringgradigen unspezifischen Entzündung, aufrechterhalten durch den kontinuierlichen Degenerationsprozeß im dauerüberbelasteten Myokard, hin. Auch die Expression von Wachstumsfaktor, TGF- $\beta_1$ , zeigte bei unseren Untersuchungen einen EF-abhängigen Verlauf. Je niedriger die EF und je eingeschränkter die Herzfunktion war um so stärker war die Intensität von TGF- $\beta_1$ .

Die vorliegenden Befunde bewiesen eine Interaktion zwischen extrazellulären Matrixproteinen, den Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta_1$ , die eng zusammenhängen und die Entwicklung der Fibrose begünstigen. Dieses kontinuierliche Fortschreiten der Fibrose im Zusammenhang mit Remodeling der Strukturkomponenten und die chronische geringgradige Entzündung sind vermutlich für den Übergang der kompensierten zur dekompenzierten Herzhypertrophie und das Endstadium der Herzinsuffizienz verantwortlich.

## 6. Referenzen

1. Strauer BE, Kramer H, Bolte H, Riecker G. [The relationships between left ventricular volumes and ejection fraction in mitral and aortic regurgitation (author's transl)]. *Klinische Wochenschrift*. 1975;53:795-84.
2. Hess OM, Schneider J, Koch R, Bamert C, Grimm J, Krayenbuehl HP. Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. Special reference to normalized viscoelastic data. *Circulation*. 1981;63:360-71.
3. Schwarz F. Function und Reserve des hypertrophierten linken Ventrikels bei Aortenklappenvitien. *Zeitschrift für Kardiologie*. 1976;65: Heft 10 :856-906:
4. Copper Gt. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Annual Review of Medicine*. 1997;48:13-23.
5. Morgan H. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu rev Physiol*. 1987;49:533-543:
6. Peterson M. protein synthesis and amino acid transport in isolated rabbit right ventricular muscle. *Circ Res*. 1972;31:317-327:
7. Rakusan k. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventrikular pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 86: 38-46. 1992;
8. Schaper j FR, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of myocardial ultrasructur and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *circulation* 83:504-514. 1991;
9. Nadal-Ginard B. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *j Clin Invest* 84 : 1693-1700. 1989;

10. Lowes BD. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha- myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myokardium. *J Clin Invest* 100:2315-2324. 1997;
11. Gwathmey Jea. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ res* 61:70-76. 1987;
12. Gwathmey Jea. The relationship of abnormal intracellular calcium mobilization to myocyte hypertrophy in human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 27:199-203. 1993;
13. Anversa Pea. Insulin-like growth factor-1 and myocyte growth: The danger of a doma. Part I. Postnatal myocardial development: Normal growth. *Cardiovasc Res* 32:219-225. 1996a;
14. Kirschenbaum LA. The cardiac cell cycle, pocket proteins and p300. *Trends Cardiovas Med*. 1995;5:230-35.
15. Schneider MD. Myocardial infarction as a problem of growth control: Cell cycle therapy for cardiac myocytes? *Journal of Cardiac Failure*. 1996;2:259-63.
16. Soonpaa MH. Assesment of cardiomyocyte DNA synthesis in the normal and injured adult mouse heart. *J Physiol*. 1997;272:H220-226;
17. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium [see comments]. *Science*. 1994;264:98-101.
18. Lichtstein J. Konfokale Mikroskopie. *Spektrum der Wissenschaft*. 1994;78-84.:
19. Grossman W. Wall stress and pattterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64. 1975;
20. Grossman Wea. Ventricular wall stress and the development of cardiac hypertrophy and failure. *Raven Press* 1-18. 1983;

21. Olivetti Gea. Myocyt cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res* 28:1199-1208. 1994a;
22. Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Research*. 1998;37:290-9.
23. Schaub. 1997;
24. Krayenbuehl HP, Hess OM, Ritter M, Monrad ES, Hoppeler H. Left ventricular systolic function in aortic stenosis. [Review] [40 refs]. 1988;
25. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study [see comments]. *New England Journal of Medicine*. 1990;322:1561-6.
26. Messerli. 1993;
27. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial infarction in rats: infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circulation Research*. 1986;58:26-37.
28. Linzbach A. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *J Cardiol* 5:370-382. 1960;
29. Hein S, Schaper J. Pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure: insights from cell morphology and biology. *Current Opinion in Cardiology*. 1996;11:293-301.
30. Schaper J, Mollnau H, Hein S, Scholz D, Munkel B, Devaux B. [Interactions between cardiomyocytes and extracellular matrix in the failing human heart]. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 1995;84:33-8.

31. Quinlan RA, Franke WW. Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79:3452-6.
32. Allen MJ, Johnson P. Desmin-containing intermediate filaments: structural analysis using monoclonal antibodies. *International Journal of Biochemistry*. 1989;21:815-23.
33. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilatation with compromised systolic function. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:2063-2076.
34. Draeger A, Amos WB, Ikebe M, Small JV. The cytoskeletal and contractile apparatus of smooth muscle: contraction bands and segmentation of the contractile elements. *Journal of Cell Biology*. 1990;111:2463-73.
35. Kaufmann E, et al. Intermediate filament forming ability of desmin lacking either the amino-terminal 67 or the carboxyterminal 27 residues. *J Mol Biol*. 185: 733-742. 1985;
36. Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Structure & Function*. 1997;22:103-116.
37. Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology*. 1994;124:827-841.
38. Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. immunoelectron microscopic studies of desmin (skeleton) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*. 1983;96:1727-35.

39. Vincent M. Persistence of an embryonic intermediate filament-associated protein in the smooth muscle cells of elastic arteries and in purkinje fibers. *J Mol Cell Cardiol*; 23: 873-882. 1991;
40. Bennett G. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J Cell Biol*; 82:577-584. 1979;
41. Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Research*. 1993;21:335-343.
42. Goldman RD, Goldman AE, Green KJ, Jones JC, Jones SM, Yang HY. Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *Journal of Cell Science - Supplement*. 1986;5:69-97.
43. Geiger B. Intermediate filaments. Looking for a function. *Nature*. 1987;329:392-3.
44. Stromer MH, Bendayan M. Immunocytochemical identification of cytoskeletal linkages to smooth muscle cell nuclei and mitochondria. *Cell Motility & the Cytoskeleton*. 1990;17:11-8.
45. Milner DJ, Weitzer T, D., Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking. *Journal of Cell Biology*. 1996;134:1255-1270.
46. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Desmin. *Molecular Cell Biology*. 1990;894-895.
47. Weitzer G, Milner DJ, Kim JU, Bradley A, Capetanaki Y. Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation. *Developmental Biology (Orlando)*. 1995;172:422-439.
48. Birk DE, Silver FH. Matrix assembly. 1991;

49. Birk DE, Zycband E. Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *Journal of Anatomy*. 1994;184:457-63.
50. Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular Matrix molecules and their receptors: function in neural development. 1991;
51. Carey DJ. Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annual Review of Physiology*. 1991;53:161-77.
52. Clyman RI, McDonald KA, Kramer RH. Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circulation Research*. 1990;67:175-86.
53. Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Experimental Cell Research*. 1992;200:272-84.
54. Korner G, Bjornsson TD, Vlodavsky I. Extracellular matrix produced by cultured corneal and aortic endothelial cells contains active tissue-type and urokinase-type plasminogen activators. *Journal of Cellular Physiology*. 1993;154:456-65.
55. Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Canadian Journal of Cardiology*. 1996;12:1259-67.
56. Yamada KM. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: Hay Ed (eds) Cell biology of extracellular matrix. *Plenum Press, New York*. 1991;111-146.
57. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *Journal of Cell Biology*. 1982;95:369-77.
58. Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG. Fibronectin: current concepts of its structure and function. *Collagen Research*. 1981;95-.



59. Stenmann S, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med.* 1978;147:1054-1064.
60. Romberger DJ. Fibronectin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1997;29:939-43.
61. Miyamoto S, Katz BZ, Lafrenie RM, Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998;857:119-29.
62. Orly J, Sato G. Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell.* 1979;
63. Tavian D, De Petro G, Colombi M, Portolani N, Giulini SM, Gardella R, Barlati S. RT-PCR detection of fibronectin EDA+ and EDB+ mRNA isoforms: molecular markers for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 1994;56:820-825.
64. Gabler U, Berndt A, Kosmehl H, Mandel U, Zardi L, Müller S, Stelzner A, Katenkamp D. Matrix remodelling in dilated cardiomyopathy entails the occurrence of oncofetal fibronectin molecular variants. *Heart.* 1996;75:358-362.
65. Halliday NL, Rayan GM, Zardi L, Tomasek JJ. Distribution of ED-A and ED-B fibronectin isoforms in Dupuytren's disease. *J Hand Surg (Am).* 1994;19:428-434.
66. Yamada KM, Akiyama SK, Hasegawa T, Hasegawa E, Humphries MJ, Kennedy DW, Nagata K, Urushihara H, Olden K, Chan WT. Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *J Cell Biochem.* 1985;28:79-97.
67. Thyberg J. Thyrophostin A9 and wortmannin perturb the Golgi complex and block proliferation of vascular smooth muscle cells. *European Journal of Cell Biology.* 1998;1:33-42.

68. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker marker of angiogenesis. *Int J Cancer*. 1994;59:612-618.
69. Chiquet-Ehrismann R. Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Cell. Biol. 3*: 800-804. 1991;
70. Ruoslahti E, Vuento M, Engvall E. Interaction of fibronectin with antibody and collagen in radioimmunoassay. *Biochem Biophys Acta*. 1978;210-.
71. Mosher DF. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *J Biol*. 1975;6614-.
72. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Balian G, Kang AH. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin: localization of the chemotactic region. *J Exp Med*. 1981;494-.
73. Alexander SA, Donoff RB. A modification of the Alcain blue method for staining hyaluronic acid substances in tissue section. *J Histotechnol*. 1980;41-.
74. Repesh LA, Fitzgerald TJ, Furcht LT. Fibronectin Involvement in Granulation Tissue and Wound Healing in Rabbits. *J of Histochemistry and Cytochemistry*. 1981;4:351-358.
75. Mathews GA, French-Constant C. Embryonic fibronectins are up-regulated following peripheral nerve injury in rats. *J Neurobiol*. 1995;26:171-188.
76. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin in wound healing in vivo. *J Invest Dermatol*. 1981; 76: 181-189. 1981;
77. Hynes R. Wound healing, inflammation, and fibrosis, in (eds.): *Fibronectin*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1990: 349-364. 1990;
78. Yamada KM, Olden K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. 1978;179-.

79. Schwarz FS, J et all. Reduced volume fraktion of myofibrils in myokardium of patients with decompensierted pressure overload. *Circulation*. 1981;63:1399-1304:
80. Nogami K, Kusachi S, Nunoyama H, Kondo J, Endo C, Yamamoto K, Murakami T, Tsuji T. Extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy. Immunohistochemical study of endomyocardial biopsy specimens. *Japanese Heart Journal*. 1996;37:483-94.
81. Tryggvason K. The laminin family. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993;5:877-82.
82. Kleinman HK, Weeks BS, Schnaper HW, Kibbey MC, Yamamura K, Grant DS. The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases. *Vitamins & Hormones*. 1993;47:161-86.
83. Martin GR, Timpl R. Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol*. 1987; 3: 57-85. 1987;
84. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Archiv*. 1996;429:311-22.
85. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M. Biological activities of laminin. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1985;27:317-25.
86. Langbein L, Kosmehl H, Katenkamp D, Neupert G, Stiller KJ. Experimentally induced murine rhabdomyosarcomas - correlations between cellular contacts, matrix formation and cellular differentiation. *Differentiation*. 1990;44:185-196.
87. Mark Kvd, Öcalan M. Antagonistic effects of laminin and fibronectin expression on the myogenic phenotype. *Differentiation*. 1989;40:150-157.

88. Grant DS, Kleinman HK, Martin GR. The role of basement membranes in vascular development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;588:61-72.
89. Clyman RI, Tannenbaum J, Chen YQ, Cooper D, Yurchenco PD, Kramer RH, Waleh NS. Ductus arteriosus smooth muscle cell migration on collagen: dependence on laminin and its receptors. *Journal of Cell Science*. 1994;107:1007-18.
90. Engel J, Odermatt E, Engel A, Madri JA, Furthmayr H, Rohde H, Timpl R. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *Journal of Molecular Biology*. 1981;150:97-120.
91. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology*. 1988;107:307-19.
92. Paulsson M, Deutzmann R, Timpl R, Dalzoppo D, Odermatt E, Engel J. Evidence for coiled-coil alpha-helical regions in the long arm of laminin. *EMBO Journal*. 1985;4:309-16.
93. Wakui S, Furusato M, Nikaido T, Yokota K, Sekiguchi J, Ohmori K, Kano Y, Ushigome S. Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in human granulation tissue in relation to capillary development. *Cell Structure & Function*. 1990;15:201-10.
94. Weber K. collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 62:757-765. 1988;
95. Speiser B, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience*. 1991;2:225-32.

96. Factor S. The effects of acutely increased ventricular cavity pressure on intrinsic myocardial connective tissue. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:1582-89:
97. Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? *American Journal of Medicine*. 1980;69:576-84.
98. Grossman W, Barry WH. Diastolic pressure-volume relations in the diseased heart. *Federation Proceedings*. 1980;39:148-55.
99. Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *European Heart Journal*. 1994;15:45-52.
100. Brilla C. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension: Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res*. 1991;69:107-115:
101. Doering C. collagen network remodeling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 1988;22:686-695:
102. Jalil J. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*. 1989;64:1041-1050:
103. Pearlman Eea. Muscle fiber orientation and connective tissue content in the hypertrophied human heart. *Lab Invest*. 1982;46:158-164:
104. Strauer B. Hypertensive heart disease. *Heidelberg: springer verlag*. 1980;23-36:
105. Brilla CG, Maisch B, Zhou G, Weber KT. Hormonal regulation of cardiac fibroblast function. *European Heart Journal*. 1995;16:45-50.

106. Sannes PL, Burch KK, Khosla J, McCarthy KJ, Couchman JR. Immunohistochemical localization of chondroitin sulfate, chondroitin sulfate proteoglycan, heparan sulfate proteoglycan, entactin, and laminin in basement membranes of postnatal developing and adult rat lungs [see comments]. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*. 1993;8:245-51.
107. Dugaard S, Strange L, Schiodt T. Immunohistochemical staining for chondroitin sulphate and keratan sulphate. An evaluation of two monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1991;95:585-9.
108. McCarthy KJ, Bynum K, St. John PL, Abrahamson DR, Couchman JR. Basement membrane proteoglycans in glomerular morphogenesis: chondroitin sulfate proteoglycan is temporally and spatially restricted during development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1993;41:401-14.
109. Avnur Z, Geiger B. Immunocytochemical localization of native chondroitin-sulfate in tissues and cultured cells using specific monoclonal antibody. *Cell*. 1984;38:811-22.
110. Erickson CA, Turley EA. Substrata formed by combinations of extracellular matrix components alter neural crest cell motility in vitro. *Journal of Cell Science*. 1983;61:299-323.
111. Knox P, Wells P. Cell adhesion and proteoglycans. I. The effect of exogenous proteoglycans on the attachment of chick embryo fibroblasts to tissue culture plastic and collagen. *Journal of Cell Science*. 1979;40:77-88.
112. Hinek A. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhesion & Communication*. 1994;2:185-93.
113. Hinek A. Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biological Chemistry*. 1996;377:471-80.

114. Töx u. Adhäsionmoleküle: eine neue Klasse von Rezeptoren mit wachsender immuologischer und klinischer Bedeutung. *Inne. Med* 19 (2/92). 1992;
115. Springer TA. Adhesion Receptors of the immunesystem. *Nature* 346, 425-434. 1990;
116. Boyd AW, Wawryk SO, Burns GF, Fecondo JV. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:3095-9.
117. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *Journal of Immunology*. 1986;137:245-54.
118. Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *Journal of Cell Biology*. 1988;107:321-31.
119. Scholz D, Schaper J. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell & Tissue Research*. 1997;290:623-31.
120. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *American Journal of Pathology*. 1997;151:671-7.
121. Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271:11090-8.

122. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 1993;184:37-45.
123. DeLisser HM, Yan HC, Newman PJ, Muller WA, Buck CA, Albelda SM. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)-mediated cellular aggregation involves cell surface glycosaminoglycans. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:16037-46.
124. Nakada MT, Amin K, Christofidou-Solomidou M, O'Brien CD, Sun J, Gurubhagavatula I, Heavner GA, Taylor AH, Paddock C, Sun QH, Zehnder JL, Newman PJ, Albelda SM, DeLisser HM. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *Journal of Immunology*. 2000;164:452-62.
125. Edelman GM, Crossin KL. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annual Review of Biochemistry*. 1991;60:155-90.
126. Walsh FS, Doherty P. Factors regulating the expression and function of calcium-independent cell adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993;5:791-6.
127. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*. 1988;52:925-33.
128. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999;66:876-88.
129. Maio M, Del Vecchio L. Expression and functional role of CD54/Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) on human blood cells. *Leukemia & Lymphoma*. 1992;8:23-33.



130. Devaux B, Scholz D, Hirche A, Klovekorn WP, Schaper J. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. *European Heart Journal*. 1997;18:470-9.
131. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266:21327-30.
132. van der Kooij MA, von der Mark EM, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJ, Morand OH. Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 1997;17:3107-16.
133. Streuli M, Hall LR, Saga Y, Schlossman SF, Saito H. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 1987;166:1548-66.
134. Charbonneau H, Tonks NK. 1002 protein phosphatases? *Annual Review of Cell Biology*. 1992;8:463-93.
135. Koretzky GA. Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *FASEB Journal*. 1993;7:420-6.
136. Ono M, Shen FW. A function of Ly-5 (CD-45) in the generation of lymphokine-activated killer cells defined by Ly-5 anti-sense oligodeoxyribonucleotides and Ly-5 monoclonal antibody. *Immunobiology*. 1995;192:172-84.
137. Reth M. Antigen receptor tail clue [letter]. *Nature*. 1989;338:383-4.
138. Clevers H, Dunlap S, Terhorst C. The transmembrane orientation of the epsilon chain of the TcR/CD3 complex. *European Journal of Immunology*. 1988;18:705-10.
139. Biassoni R, Ferrini S, Prigione I, Moretta A, Long EO. CD3-negative lymphokine-activated cytotoxic cells express the CD3 epsilon gene. *Journal of Immunology*. 1988;140:1685-9.

140. Lehmann PF, Donabedian H, Sawyer T. Expansion of a T lymphocyte subpopulation (CD3+,4-,8-) after immunodepression associated with disseminated histoplasmosis. *International Archives of Allergy & Applied Immunology*. 1987;84:311-5.
141. Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell*. 1991;64:875-8.
142. Malissen B, Schmitt-Verhulst AM. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Current Opinion in Immunology*. 1993;5:324-33.
143. Weiss A, Iwashima M, Irving B, van Oers NS, Kadlecsek TA, Straus D, Chan A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor signal transduction. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 1994;365:53-62.
144. Adair JR, Athwal DS, Bodmer MW, Bright SM, Collins AM, Pulito VL, Rao PE, Reedman R, Rothermel AL, Xu D, et al. Humanization of the murine anti-human CD3 monoclonal antibody OKT3. *Human Antibodies & Hybridomas*. 1994;5:41-7.
145. Hammond EH, Watson FS, Bristow MR, O'Connell JB, Gilbert EM, Doty DB, Renlund DG. Fibrinoid necrosis of a temporal artery complicating the treatment of refractory cardiac allograft rejection with murine monoclonal CD3 antibody (OKT3). *Journal of Heart Transplantation*. 1990;9:236-8.
146. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*. 1991;64:271-80.
147. Massague J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, Lopez-Casillas F, Ohtsuki M, Wrana JL. TGF-beta receptors. *Molecular Reproduction & Development*. 1992;32:99-104.
148. Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surveys*. 1992;12:81-103.

149. Massague J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell*. 1993;69:1067-70.
150. Sha X. Identification and analysis of discrete functional domains in the Pro region of pre\_pro-Transforming growth factor beta1. *J.Cell.Biol.*114: 827-839. 1991;
151. Roberts AR. The transforming growth factor and their receptors. 1990;
152. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regulation*. 1990;1:875-82.
153. Akhurst R, et al. TGF beta in murine morphogenetic processes: The early embryo and cardiogenesis. *Development* 108:645-656. 1990;
154. Millan FA. embryonic gene expression patterns of TGFbeta1,2,3 suggest different development function in vivo. *Divolopment* 111:131-144. 1991;
155. Dickson M, et al. RNA and protein localisations of TGF-beta-2 in the early mouse embryo suggest an involvment in cardiac development. *Devolopment* 117:625-639. 1993;
156. Flaumenhaft R. The extracellular regulation of growth factor action. *Mol. Biol. Cell* 3:1057-1065. 1992;
157. Ruoslahti E. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867-869. 1991;
158. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. 1993;75:1351-9.
159. Ruscetti FW, Palladino MA. Transforming growth factor-beta and the immune system. *Progress in Growth Factor Research*. 1991;3:159-75.
160. Kingsley D. The TGF-b superfamily: new members, new receptors, and new genetikt tests of function in different organismus. *Genes Dev* 8: 133-146. 1994;

161. MacLellan WR, Brand T, Schneider MD. Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Circulation Research*. 1993;73:783-91.
162. Rasmussen L. Vascular smooth muscle cells from injured rat aortas display elevated matrix production associated with transforming growth factor-beta activity. *Am J Pathol*, 147: 1041-1048. 1995;
163. Cercek B, Scharifi B,. Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis. *Am J Cardiol*, 68: 24C-33C. 1991;
164. Cheifetz S, Bellon T. Endoglin is a component of the TGF-beta receptor system in human endothelial cells. *J.Biol Chem* 267: 19027-19030. 1992;
165. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83:4167-71.
166. Brand T, Schneider M. D. The TGF-Beta Superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and Function. *Mol Cell Cardiol* 27, 5-18. 1995;
167. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 1992;360:361-4.
168. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1990;85:507-14.
169. Slager HG, Van Inzen W, Freund E, Van den Eijnden-Van Raaij AJ, Mummery CL. Transforming growth factor-beta in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Developmental Genetics*. 1993;14:212-24.

170. Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:1018-22.
171. Waltenberger J, Lundin L, Oberg K, Wilander E, Miyazono K, Heldin CH, Funai K. Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *American Journal of Pathology*. 1993;142:71-8.
172. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors*. 1988;1:91-9.
173. Casscells W, Bazoberry F, Speir E, Thompson N, Flanders K, Kondaiah P, Ferrans VJ, Epstein SE, Sporn M. Transforming growth factor-beta 1 in normal heart and in myocardial infarction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;593:148-60.
174. Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Jr., Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94:1470-6.
175. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995;92:2385-90.
176. Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circulation Research*. 1994;75:23-32.

177. Brooks WW, Bing OH, Conrad CH, O'Neill L, Crow MT, Lakatta EG, Dostal DE, Baker KM, Boluyt MO. Captopril modifies gene expression in hypertrophied and failing hearts of aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1362-8.
178. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 1994;331:1286-92 histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF-beta 1 null mouse phenotype.
179. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93:1172-8.
180. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261:4337-45.
181. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circulation Research*. 1991;69:483-90.
182. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO Journal*. 1987;6:1899-904.
183. Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J. Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:17467-74.
184. Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2000;32:187-95.

## 7. Anhang

### 7.1. Rezepte

<p><b>I. Zusammensetzung des PBS</b></p> <p>NaCl 137,0 mmol KCl 2,7 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mmol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,0 mmol Zu insgesamt ein Liter mit H<sub>2</sub>O dest auffüllen. pH 7,35</p>
<p><b>II. Zusammensetzung von Tissue Tec der Fa. Miles Inc.:</b></p> <p>10.24% w/w Polyvinylalkohol 04.26% w/w Polyethylenglycol 85.50% w/w nonreactive ingredients</p>
<p><b>III. Beschichten von Objektträgern</b></p> <p>200 ml reines Aceton mit 4000 ml 2%ige 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (Sigma, St. Louis, USA) zusammensetzen</p> <p>Aceton Aceton Destilliertes Wasser Destilliertes Wasser</p> <p>Dann die Objektträger in jedes Becken etwa 5 sec. eintauchen, und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C trocknen lassen</p>
<p><b>IV. Rezept für Eindeckmedium MOWIOL</b></p> <p>4 ml PBS (pH-8.0) + 1 g MOWIOL rühren 16h + 2ml H<sub>2</sub>O freies Glycerin rühren 16h mit Rotor JA 20 bei 12000 rpm zentrifugieren (17100g) 15 min Überstand abgießen und kühl lagern.</p>

## **V. HE-Färbung**

Die Objektträger wurden 10 Minuten lang in Hämalain eingetaucht, dann unter fließendem Wasser gewaschen.

Danach Eintauchen der Schnitte in Aqua dest. und 6 min mit Eosin färben, und kurz in aufsteigende Alkoholreihe ( 95%, und 100%) und Xylol eintauchen.

Hierbei färben sich die Zellkerne bläulich, und die Zellen rötlich an

## **7.2. Abkürzungen**

<b>CD</b>	Cluster differentiation
<b>DCM</b>	Dilatative Kardiomyopathie
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>ICAM</b>	Interzellular Adhäsionsmolekül
<b>IL2</b>	Interleukin 2
<b>Lck</b>	Mitglied der Proteintyrosinkinase
<b>LV</b>	Linker Ventrikel
<b>MG</b>	Molekulargewicht
<b>PDGF</b>	platelet-derived-growth-factor
<b>PECAM</b>	Plättchen- Endothelzell-Adhäsionsmolekül
<b>RPM</b>	rounds per minute
<b>TCR</b>	T-Zellrezeptorkomplex
<b>TGF-<math>\beta_1</math></b>	Transforming Growth Factor $\beta_1$



## 8. Lebenslauf

Farzaneh Badbanchi, geboren am 21 Februar 1970 in Tehran/Iran

Eltern                      Reza Badbanchi  
                                 Fakhri Mohammad-Negad-Farid

### Schulbildung

1976 – 1981	Grundstufe (Karadj/Iran)
1981 – 1984	Mittelstufe (Karadj/Iran)
1984 – 1988	Gymnasium (Karadj/Iran)
1988	Abitur: Emperische Wissenschaften

### Studium

1988 - 1990	Freie Universität Karadj (Mikrobiologie)
22.08.1990	Ausreise aus Iran

### Deutschkurs

03.09.1990–28.02.1991    „Bachschule“ in Frankfurt am Main

### Studienkolleg

17.12.1991	Feststellungsprüfung
------------	----------------------

### Studium

SS 1992	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
SS 1995	Ärztliche Vorprüfung
WS 1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 1997	wissenschaftliche Tätigkeit am Max-Planck-Institut, Abt. für Experimentelle Kardiologie in Bad Nauheim
SS 1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1999	Beginn des Praktischen Jahres Evangelischen Krankenhaus Gießen (Chirurgie, Innere Medizin); Kreiskrankenhaus Giessen in Lich (Gynäkologie als Wahlfach)
Mai 2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Februar 2001	Ärztin im Praktikum ( Fachbereich Gynäkologie) in der Dr.Horst-Schmidt-Kliniken Wiesbaden



## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und ihre sehr herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation. Desweiteren bedanke ich mich für die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe,

Herrn Gerhard Stämmeler für die vielen wertvollen Tips, die große Geduld bei wiederholtem Nachfragen zu Problemen im EDV-Bereich und für seine Mithilfe bei der Verwirklichung des Werkes,

Herrn Gunther Schuster für seine große Hilfsbereitschaft bei der Lösung computertechnischer Probleme und besonders der Bearbeitung digitaler Bilder,

Frau Beate Grohmann für die Einführung in die immunzytochemischen Arbeitstechniken und ihre fortwährende freundliche Unterstützung und Kameradschaft,

Frau Brigitte Matzke für ihre Geduld bei der Einführung in die konfokale Mikroskopie,

Frau Johana Afsah-Hedjri und Frau Gaby Klein für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts,

Den Mitarbeitern innerhalb unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre,

und nicht zuletzt meinem Mann Herrn Abdollah Afsah-Hedjri für seine moralische und liebevolle Unterstützung.

Besonders möchte ich meiner Familie danken ins Besondere meinen Eltern, Faghri und Reza Badbanchi und meiner Schwester Homeira, die mir das Studium ermöglicht haben.